

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	11
INTRODUCTION	12
<u>Chapitre I : Le cancer du sein.</u>	13
1.1. La glande mammaire, généralités	14
1.2. L'oncogenèse mammaire	16
1.1.1 Schéma général.	
1.1.2 Altérations génétiques et épigénétiques.	
1.1.3 Évolution spatio-temporelle des altérations génétiques et épigénétiques.	
1.3. Classifications des cancers du sein	20
1.3.1. Classifications sur critères anatomo-pathologiques.	
1.3.2. Classifications sur critères moléculaires.	
1.4. Thérapies des cancers du sein	24
1.4.1. Thérapie ciblée anti-HER2.	
1.4.2. Hormonothérapies.	
1.5. Les cancers du sein triple-négatifs	27
1.5.1. Définition.	
1.5.2. Caractéristiques.	
1.5.2. Options thérapeutiques.	
1.6. Conclusions du chapitre I	33
<u>Chapitre II : L'invasion</u>	34
2.1. Généralités	34

2.2. Les différents modes de migration	38
2.2.1. La migration amiboïde.	
2.2.2. La migration mésenchymateuse.	
2.2.2.1. La transition épithélio-mésenchymateuse	
2.2.2.2. Le modèle cyclique de la migration mésenchymateuse.	
2.2.3. La migration collective.	
2.2.4. Le flux multicellulaire.	
 2.3. La formation de protrusions	43
2.3.1. Les lamellipodes.	
2.3.2. Les filopodes.	
2.3.3. Les invadopodes.	
2.3.4. Les Rho-GTPases.	
 2.4. Les adhérences à la matrice extracellulaire.....	50
2.4.1. La matrice extracellulaire.	
2.4.2. Les intégrines.	
2.4.3. Les complexes d'adhérences.	
2.4.4.. Dynamique des adhérences de cellules en migration	
2.4.4.1. Les adhérences naissantes.	
2.4.4.2. Les complexes focaux.	
2.4.4.3. Les adhérences naissantes.	
 2.5. Conclusions du chapitre II.....	61
 <u>Chapitre III : La kinase des adhérences focales (FAK).....</u>	62
3.1. Généralités	62
3.2. Structure et régulations de FAK	64
3.2.1. Structure.	
3.2.1.1. Le domaine FERM.	
3.2.1.2. Le domaine kinase.	
3.2.1.3. Le domaine FAT.	
3.2.2. Modifications post-traductionnelles.	
3.2.2.1. Phosphorylations sur tyrosines.	
3.2.2.2. Phosphorylations sur sérines et thréonines.	
3.2.2.3. Sumoylation.	

3.2.3. Activation de FAK	
3.2.3.1. Levée de l'auto-inhibition	
3.2.3.2. Signaux induisant l'ouverture de FAK.	
3.2.3.3. Dimérisation de FAK	
2.2.4. Le flux multicellulaire.	
3.3. Fonctions de FAK	73
3.3.1. Implication de FAK dans le développement.	
3.3.2. FAK et cancers : données cliniques.	
3.3.2.1. Surexpression.	
3.3.2.2. Influence sur les pronostics.	
3.3.3. Rôles de FAK dans l'oncogénèse.	
3.3.3.1. Implication de FAK dans la survie cellulaire.	
3.3.3.2. Implication de FAK dans la prolifération cellulaire.	
3.3.3.3. Implication de FAK dans la migration cellulaire.	
3.3.3.3.1. Polarisation des cellules en migration.	
3.3.3.3.2. Dynamique des adhérences à la matrice.	
3.3.3.3.2.1. Assemblage des adhérences	
3.3.3.3.2.2. Recrutement de FAK aux adhérences	
3.3.3.3.2.3. Désassemblage des adhérences.	
3.3.3.3.3. Réorganisation du cytosquelette d'actine.	
3.3.3.3.3.1. Les protrusions	
3.3.3.3.3.2. Les Rho-GTPases.	
3.4. FAK en thérapie	84
3.5. Conclusions du chapitre III	85
<u>Chapitre IV : La Protéine Kinase C thêta (PKCθ)</u>	87
4.1. La famille des PKCs	87
4.1.1. Structures.	
4.1.2. Activation	
4.1.3. Fonctions.	
4.2. La PKCθ: structure et régulations	92
4.2.1. Structure.	
4.2.2. Activation.	
4.2.3. Phosphorylations.	
4.3. Fonctions de PKCθ	95

- 4.3.1. Implication de PKC θ dans le système immunitaire.
 - 4.3.1.1. PKC θ et la synapse immunologique.
 - 4.3.1.2. Rôles de PKC θ dans l'activation des Lymphocytes T.
 - 4.3.1.2. Rôles de PKC θ dans la différenciation des Lymphocytes T.
- 4.3.2. PKC θ dans les muscles squelettiques.
- 4.3.3. PKC θ et cancer.
 - 4.3.3.1. Tumeurs stromales digestives
 - 4.3.3.2. Cancers du sein.

OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE103

RESULTATS104

Chapitre V : Étude de l'implication de FAK dans le contrôle de l'invasion par PKC θ105

5.1. Contexte de l'étude et principaux résultats.....105

5.2. Article.....107

Chapitre VI : Étude du contrôle de PKC θ par CDCP1 dans les cancers du sein triple-négatifs165

6.1. Introduction.....165

6.2. Résultats.....167

6.2.1. CDCP1 est essentiel aux effets de PKC θ sur l'invasion.

6.2.2. CDCP1 contrôle positivement l'activité de PKC θ sur FAK.

6.2.3. CDCP1 interagit avec PKC θ et est localisé au front de cellules en migration.

6.3. Conclusion et perspectives.....171

MATERIEL ET METHODES176

DISCUSSION.....182

Chapitre VII : Comment PKC θ contrôle-t-elle l'invasion des lignées CSTN in vitro ?183

7.1. PKC θ n'influence pas la transition épithélio-mésenchymateuse.....	183
7.2. Implication des protéases dans les effets de PKC θ	184
7.3. Le contrôle de l'invasion par PKC θ dépend de FAK	185
7.3.1. Phosphorylation directe de FAK par PKC θ sur les sérines 892-893.	
7.3.2. Comment expliquer le contrôle de l'invasion par PKC θ non attribuable aux phosphorylations S892-893 de FAK ?	
7.3.2.1. Phosphorylation directe de FAK sur la thréonine 656 ?	
7.3.2.2. Implication de Fra1.	
7.3.2.3. PKC θ induit l'ouverture de FAK.	
7.3.2. PKC θ induit la signalisation de FAK.	
<u>Chapitre VIII : Comment PKCθ affecte-t-elle la dynamique des adhérences?</u>	189
8.1. Réflexions sur l'outil PKC θ activable par la rapamycine.	190
8.1.1. Interaction et phosphorylations	
8.1.2. Effets de la rapamycine	
8.1.3. Apports de l'outil	
8.2. Comment les phosphorylations S892-893 impactent la dynamique des adhérences ?	192
8.2.1. Les phosphorylations 892-893 affectent la localisation intracellulaire de FAK.	
8.2.2. Les phosphorylations 892-893 affectent l'interaction de FAK avec la paxilline.	
<u>Chapitre IX : Comment PKCθ affecte-t-elle la dynamique des protrusions ?</u>	197
9.1. Implication des phosphorylations S892-893 et de RhoA.	197
9.2. Liens entre les effets de PKC θ sur les adhérences et ceux sur les protrusions ?	198
<u>Chapitre X : Comment PKCθ est-elle régulée dans les CSTN ?</u>	199

10.1. Régulation des fonctions de PKC θ	199
10.2. Régulation de l'expression de PKC θ	200
<u>Chapitre XI : Comment PKCθ contrôle-t-elle la formation de métastases?</u>	201
11.1. PKC θ et les étapes du processus métastatique.	201
11.2. Implication des phosphorylations 892-893.	202
11.3. Implication de PKC θ dans les cancers du sein de patientes.	203
<u>Chapitre XII : PKCθ en tant que cible thérapeutique des CSTN ?</u>	205
12.1. Faible toxicité.....	205
11.2. Inhibiteurs pharmacologiques..	205
11.3. Cibler la voie PKC θ /FAK ?	206
11.4. Risques de résistances.	207
CONCLUSION GENERALE.....	208
ABBREVIATIONS.....	210

TABLE DES FIGURES

- Figure 1. Schéma de l'anatomie du sein et d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire. p15
- Figure 2. La progression tumorale mammaire. p17
- Figure 3. Effet du Trastuzumab sur la survie sans récurrence et globale. p25
- Figure 4. Sites de rechutes métastatiques dans les cancers du sein triple-négatifs et non triple-négatifs. p28
- Figure 5. Probabilité de survie des patientes de cancer du sein triple-négatifs comparativement aux patientes d'autres types de cancers du sein p29
- Figure 6. Taux de rechutes métastatiques des patientes de cancer du sein triple-négatifs comparativement aux patientes d'autres types de cancers du sein p29
- Figure 7. L'invasion dans le modèle de la cascade métastatique. p35
- Figure 8. Modes de migration lors de l'invasion tumorale. p37
- Figure 9. Modèle cyclique en 5 étapes de la migration mésenchymateuse. p41
- Figure 10. Modèle de formation des lamellipodes et des filopodes. p46
- Figure 11. Cycle d'activation des Rho GTPases. p50
- Figure 12. La matrice extracellulaire. p51
- Figure 13. Schéma d'une adhérence focale. p55
- Figure 14. Dynamique des adhérences d'une cellule en migration. p60
- Figure 15. Première image publiée d'immunofluorescence de FAK. p63
- Figure 16. Structure, sites de phosphorylation et interactions de FAK. p65
- Figure 17. Modèle d'activation/inactivation de FAK. p71
- Figure 18. Vue d'ensemble du contrôle de la migration/invasion cellulaire par FAK. p86
- Figure 19. Structure des PKCs. p88
- Figure 20. Structure et sites de phosphorylations de PKC θ . p95
- Figure 21. Fonction de PKC θ dans l'activation des lymphocytes T. p98
- Figure 22. Fonction de PKC θ dans les cellules de cancer du sein. p102
- FIGURES ARTICLE. p107-p164
- Figure 23. Les effets de PKC θ sur l'invasion dépendent entièrement de CDCP1. p169
- Figure 24. Une inhibition de CDCP1 diminue fortement la phosphorylation sur FAK 892-893. p170
- Figure 25. Une inhibition de CDCP1 diminue fortement l'activation de PKC θ . p170
- Figure 26. CDCP1 interagit avec PKC θ et se localise au front de cellules en migration. p172
- Figure 27. L'inhibition de CDCP1 n'affecte pas le niveau d'interaction entre PKC θ et FAK. p173
- Figure 28. Schéma de la sonde FRET de la Rho GTPase Rac p180
- Figure 29. Schéma de la sonde FRET de la Rho GTPase RhoA p180
- Figure 30. Schéma de la sonde FRET de la Rho GTPase Rac p181
- Figure 31. Rôle des MMPs dans le contrôle de l'invasion de MCF7 par PKC θ . p185
- Figure 32. Le signal de la PKC θ activé (T538) est fortement diminué autour des adhérences matures. p193
- Figure 33. Interaction de FAK 892-893E avec la paxilline. p194
- Figure 34. Les effets de PKC θ sur l'invasion dépendent entièrement de l'intégrine β 1. p200
- Figure 35. Grade de tumeurs de patientes de cancer du sein en fonction du niveau d'expression de PKC θ . p204
- Figure 36. Survie à 1 an et 5 ans des patientes de cancer du sein en fonction du niveau d'expression de PKC θ ou du nombre de copies du gène *PRKCC*. p204
- Figure 37. Conclusion générale: modèle du contrôle de l'invasion par la Protéine Kinase C θ dans les cancers du sein. p209

INTRODUCTION

Chapitre I : Le cancer du sein.

Le papyrus d'Edwin Smith (2500 av J.C.) constitue la première trace d'interrogation de l'être humain sur le cancer du sein avec la description de huit cas de tumeurs mammaires. Les auteurs de ce document expriment leur impuissance face à cette pathologie et conseillent de s'en remettre au divin. Plus de 4500 ans plus tard, bien que d'énormes progrès aient été faits dans la compréhension de cette maladie, le cancer du sein reste un sujet de préoccupation majeur. En 2013, 1,7 millions de nouveaux cas de cancer du sein et 522 000 décès par cancer du sein ont été estimés dans le monde (Globocan, 2012). Avec 48 763 nouveaux cas et 11 886 décès recensés en France cette même année, le cancer du sein est ainsi la première cause de mortalité par cancer chez la femme, en France et à l'échelle mondiale (Source : *Les cancers en France en 2014*).

Des disparités géographiques sont cependant observées avec une incidence dans les pays industrialisés nettement supérieure à celle dans les pays en voie de développement (66,4 cas pour 100 000 habitants contre 27,3 pour 100 000 habitants respectivement). Parmi les facteurs de risque sont retrouvés le sexe et l'âge: 99% des cas de cancers du sein sont détectés chez des femmes qui ont, dans 8 cas sur 10, plus de cinquante ans (Jemal et al., 2011).

Dans ce premier chapitre, je m'attacherai à faire une synthèse de l'état actuel des connaissances sur le cancer du sein.

Commençons par une brève description de la glande mammaire qui permettra de mieux comprendre le processus général d'oncogenèse mammaire ou les différentes classifications du cancer du sein, thématiques abordées plus loin dans le chapitre.

1.1. La glande mammaire, généralités.

La glande mammaire est une glande exocrine qui se développe tout au long de la vie d'une femme. Elle constitue la base de distinction des mammifères. Sa fonction biologique principale est d'assurer la sécrétion du lait nécessaire à la nutrition et aux défenses immunitaires du nouveau-né.

D'un point de vue structurel, la glande mammaire de la femme adulte comprend un épithélium formant un réseau de lobes, unités productrices du lait reliées au mamelon par les canaux galactophores. Cet épithélium est constitué de deux couches de cellules : les cellules luminales, qui lors de leur différenciation terminale produisent et sécrètent le lait, et les cellules basales myoépithéliales dont la contraction permet l'expulsion du lait jusqu'au mamelon (Visvader et al., 2009 ; **Figure 1,A**). Des marqueurs spécifiques de ces deux types de cellules épithéliales permettent de les différencier. Ainsi, les cellules luminales expriment les cytokératines CK 7, CK8, CK18, CK19 et certaines d'entre elles expriment des récepteurs hormonaux (œstrogènes, progestérone et prolactine). Les cellules myoépithéliales expriment quant à elles les cytokératines 5, 14 et 17 et des marqueurs des cellules musculaires lisses telles que l'actine musculaire lisse (Abd El-Rehim et al., 2004).

L'épithélium mammaire comprend aussi un faible nombre de cellules souches mammaires dont les localisations et fonctions exactes restent à préciser (Lloyd-Lewis et al., 2017).

Cet épithélium est entouré d'un stroma dont il est séparé par une lame basale sécrétée par les cellules myoépithéliales (**Figure 1,B**). La lame basale encapsule la glande mammaire et est essentielle au maintien de la polarité des cellules épithéliales mammaires. Elle est principalement composée de collagène de type IV, de laminine, d'épiligrine, d'entactine et de protéoglycanes (Oskarsson et al., 2013). Le stroma constitue le tissu de soutien de la glande mammaire et comprend de nombreux adipocytes, des fibroblastes et quelques cellules de l'immunité innée. En son sein, se situent également les systèmes d'innervation et d'irrigation sanguine et lymphatique, le tout englobé dans une matrice extracellulaire riche en collagène (Arendt et al., 2010).

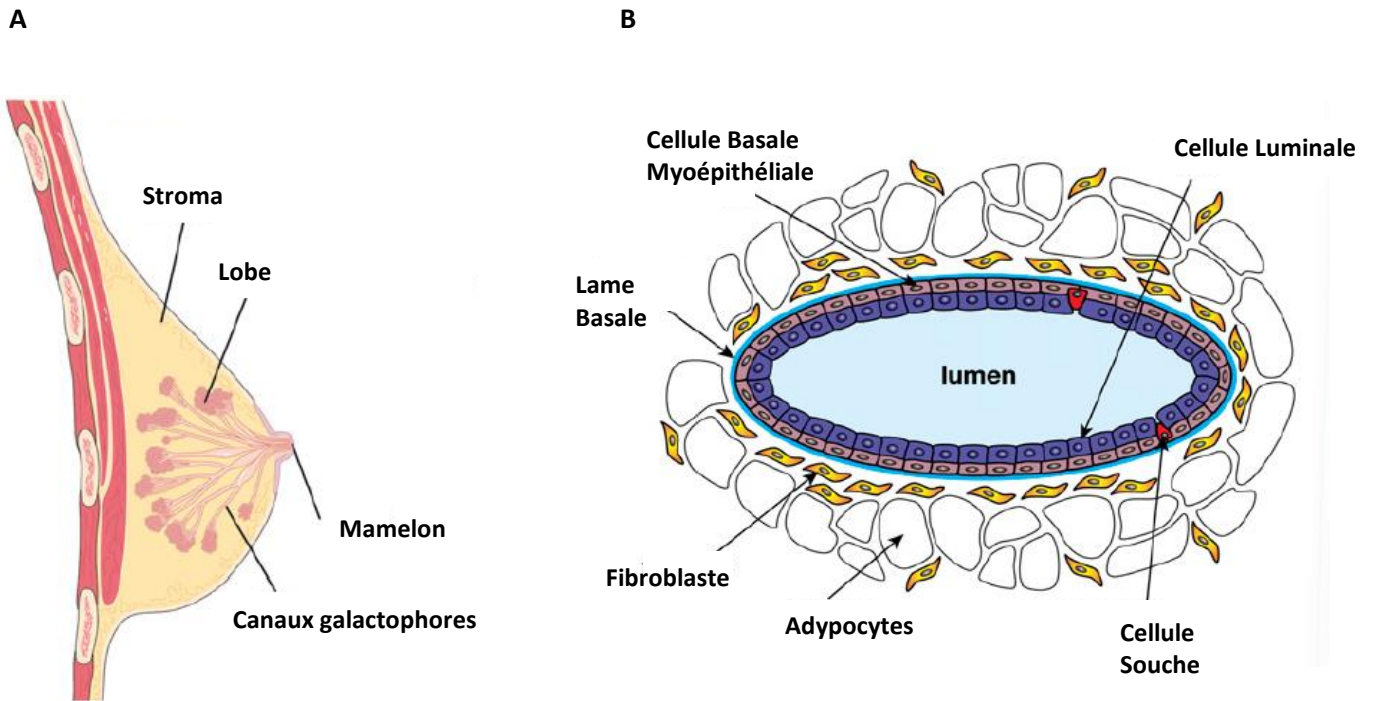


Figure 1. Schéma de l'anatomie du sein (A) et d'une coupe transversale d'un canal de la glande mammaire (B). Le sein est constitué d'un épithélium formant un réseau de lobes et de canaux galactophores entouré d'un stroma riche en adypocytes. Cet épithélium est constitué de cellules luminales et de cellules myoépithéliales constituant deux couches distinctes et séparées du stroma par une lame basale. D'après Visvader et al.,2009.

Une bonne communication entre ces deux compartiments est essentielle au développement de la glande mammaire qui a lieu tout au long de la vie d'une femme. En effet, la structure de la glande mammaire subit de nombreuses transformations durant la puberté, les cycles menstruels, les gestations et périodes de lactation, et ce, jusqu'à la ménopause. Ainsi, principalement sous l'influence des hormones sexuelles et de facteurs de croissances, se succèdent dans l'épithélium mammaire des phases de prolifération, de différenciation nécessaire à la production du lait et des phases de dégénération par apoptose.

La biologie particulière de la glande mammaire l'expose à des processus d'oncogénèse.

1.2. L'oncogenèse mammaire

1.2.1. Schéma général

Les cancers du sein sont définis par une prolifération maligne au niveau du sein. Une grande majorité des cancers du sein (95%) sont des adénocarcinomes se développant à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire.

Les adénocarcinomes se localisent principalement au niveau des canaux (80% des cancers du sein invasifs) mais aussi dans 10 % des cas au niveau des lobes, appelés respectivement adénocarcinomes canaux et lobulaires (Bombonati et Sgroi.,2010 ; Polyak et al, 2007).

Le modèle le plus communément admis de progression tumorale mammaire s'appuie sur différentes études moléculaires, épidémiologiques et pathologiques. Il admet que la première phase de développement d'un cancer du sein est une hyperplasie atypique de l'épithélium mammaire caractérisée par une prolifération anormale des cellules épithéliales et un début de désorganisation de l'épithélium mammaire. Cette hyperplasie peut évoluer en adénocarcinome *in situ*, proliférant dans la lumière des canaux, puis en adénocarcinome infiltrant, dont les cellules tumorales ont franchi la lame basale (Bombonati et Sgroi, 2010; **Figure 2**). L'invasion de la lame basale constitue la première étape de la cascade métastatique. Les cellules tumorales peuvent alors envahir le stroma environnant et migrer au travers de la matrice extracellulaire pour rejoindre les vaisseaux sanguins et lymphatiques par intravasation, la présence de ces vaisseaux sanguins pouvant être le résultat de phénomènes d'angiogenèse tumorale. Les cellules tumorales peuvent par la suite quitter la circulation sanguine pour se disséminer et proliférer dans d'autres organes, principalement aux os, au foie et aux poumons. Le cancer du sein est alors dit métastatique (Polyak et al, 2007 ; Rivenbark et al., 2013) (**Figure 5**).

Ainsi, de ce schéma général sur le cancer du sein il apparait que les cellules tumorales mammaires doivent franchir une série d'étapes communes afin de passer du stade de l'hyperplasie à celui cancer métastasé. Les différences apparaissent dans les facteurs permettant aux cellules tumorales de franchir ces barrières, variant d'un cancer du sein à l'autre mais aussi au sein d'un même cancer, définissant ainsi des hétérogénéités inter- et intra-tumorales. L'acquisition aléatoire d'altérations géniques, leur sélection mais également

des différences dans les cellules d'origine sont source de cette complexité. Celle-ci est percevable dans la grande variabilité des différents profils de mutations et altérations épigénétiques que vont acquérir les cellules tumorales de patientes de cancer du sein. À cela s'ajoute encore un autre niveau de complexité avec la prise en compte récente de l'importance de l'environnement tumoral.

1.2.2. Anomalies génétiques et épigénétiques.

D'un point de vue moléculaire, l'initiation du cancer du sein est la résultante d'apparition d'anomalies génétiques et épigénétiques dans une cellule unique. Ces anomalies peuvent avoir différentes conséquences à l'échelle de la cellule, avec une modification des niveaux d'expression de certaines protéines et/ou de leur fonction, pouvant ainsi affecter notamment l'architecture ou même les voies de signalisation cellulaire. Ainsi, elles lui accordent progressivement les propriétés d'une cellule cancéreuse capable de se multiplier de façon anarchique et d'envahir les tissus environnants. (Hanahan et al., 2000 ; Bombonati et al., 2011).

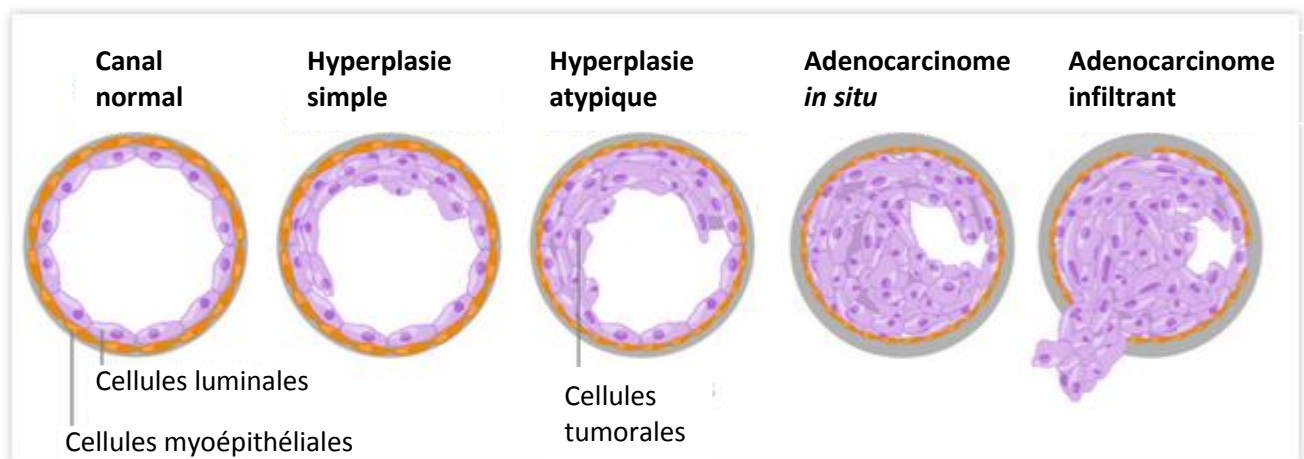


Figure 2. La progression tumorale mammaire. D'après aegiscreative.com

Différentes études de séquençage effectuées sur des tumeurs primaires de patientes de cancer du sein ont montré que plusieurs types d'aberrations moléculaires peuvent affecter les tumeurs mammaires telles que des mutations ponctuelles, des insertions/délétions ou des amplifications (Zardavas et al., 2015). Parmi les gènes les plus fréquemment mutés (plus de 10% des patientes), on retrouve *GATA3*, codant pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation luminale; *TP53*, codant pour la protéine p53 régulatrice du cycle cellulaire et de l'apoptose et *PIK3CA*, codant pour la protéine phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) impliquée dans la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR régulant notamment la prolifération et la différenciation cellulaire (Cancer Genome Atlas, 2012). En dehors de ces gènes-là, la fréquence des mutations observées est très basse sur l'ensemble des tumeurs, mettant ainsi en évidence la grande hétérogénéité inter-tumorale et l'importance des classifications des tumeurs mammaires. La fréquence de ces mutations est hétérogène suivant le sous type de cancers du sein (Zardavas et al., 2015 ; Walerych et al., 2012 ; Usary et al., 2004 ; Rivenbark et al., 2013).

Parmi les altérations épigénétiques les plus fréquentes, on retrouve des modifications du statut de méthylation de certains gènes pouvant être hypo-ou hyperméthylés tel que *BRCA1* (réparation de l'ADN) ou le récepteur alpha à l'œstrogène (RE α) affectant leurs niveaux d'expression. Il faut noter que 3% des patientes atteintes de cancer du sein sont porteuses de mutations sur ce gène *BRCA1* (Jovanic et al., 2010 ; Martelotto et al., 2014).

S'ajoute à cette hétérogénéité inter-tumorale, une hétérogénéité intra-tumorale: plusieurs études ont montré qu'au sein d'une même tumeur primaire les cellules tumorales peuvent présenter des profils de mutations différents. Aussi, les travaux de Shah et collègues semblent montrer que cette hétérogénéité tumorale peut affecter les mutations de gènes les plus fréquemment retrouvées entre les patientes telles que ceux mentionnés plus haut *TP53* et *PI3KCA* (Shah et al., 2012).

1.1.3. Evolution spatio-temporelle des altérations génétiques et épigénétiques.

Ces altérations peuvent évoluer avec la progression tumorale mammaire (hétérogénéité intra-tumorale temporelle). Ainsi, Heselmeyer-Haddad et al. ont observé en 2012 un gain d'instabilité chromosomique dans les cellules tumorales d'adénocarcinomes infiltrants comparés aux adénocarcinomes *in situ* correspondants.

Cependant, plusieurs études ont permis de constater qu'il n'y avait pas de différence d'expression génique dans les cellules tumorales entre ces deux stades. De façon intéressante, deux groupes indépendants ont par contre constaté une forte différence d'expression génique entre les cellules myoépithéliales associées aux carcinomes *in situ* et celles associées aux carcinomes infiltrants (Polyak, 2007 ; Bombonati et al., 2011 ; Allinen et al., 2004 ;). Une proportion importante de ces modifications concerne des gènes codant pour des protéines sécrétées et des récepteurs impliqués dans des régulations paracrine/autocrine et dans les processus d'invasion et de migration. De plus, des travaux récents menés chez la souris ont montré que les cellules myoépithéliales murines perdent progressivement certains marqueurs de différenciation (actine lisse) au cours de la progression tumorale (Russel TD et al., 2015). Ces résultats mettent en avant l'importance de l'environnement tumoral dans les premières phases de développement du cancer du sein. Son rôle est également essentiel dans la dissémination métastatique. Aussi, l'environnement de la tumeur primaire est radicalement différent de celui des sites métastatique et l'adaptation de la cellule tumorale à ce nouvel environnement est une étape critique de la formation de métastases (Valastyan and Weinberg, 2011). Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence une hétérogénéité génétique entre les tumeurs primaires et les lésions métastatiques de patientes (Kuukasjärvi et al., 1997 ; Torres et al., 2007). De plus, les profils d'expression géniques de cellules de métastatiques issues de tumeurs mammaires diffèrent selon l'organe dans lequel se localisent les métastases. Ainsi, le groupe de Joan Massagué a montré sur modèle murin, des lignées cellulaires et des échantillons de patientes que l'expression de gènes particuliers favorisait la colonisation des os ou des poumons (Minn et al., 2005).

D'autres études mettent en avant l'importance de la communication entre les cellules tumorales et les cellules de l'organe colonisé dans la formation de métastases. Ainsi, l'expression des gènes permettant l'adaptation des cellules tumorales au nouvel

environnement peut être favorisée par des éléments constituant de cet environnement. Ainsi, dans des cerveaux de souris, les astrocytes sont capables d'induire des modifications d'expression géniques dans des cellules métastatiques issues de tumeurs mammaires, favorisant ainsi leur survie (Kim et al., 2011).

L'étude des altérations génétiques et épigénétiques au sein des cellules tumorales mammaires permet de comprendre que le cancer du sein n'est pas une pathologie unique mais bien une maladie très hétérogène. Depuis plusieurs décennies, les médecins et les chercheurs considèrent cette grande complexité en prenant en compte l'hétérogénéité inter-tumorale par l'utilisation de différentes classifications des cancers du sein.

1.3. Classifications des cancers du sein.

1.3.1. Classifications sur critères anatomo-pathologiques

Les tumeurs mammaires peuvent être classées comme d'autres tumeurs solides suivant leur stade qui permet de déterminer dans quelle mesure le cancer du sein s'est propagé. Le système le plus couramment utilisé depuis plus de cinquante ans en France et internationalement est la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis). Celle-ci s'appuie sur la taille de la tumeur primaire, le nombre de ganglions envahis et la présence de métastases (UICC, 2009).

Les cancers du sein sont également classés selon leur grade qui donne une indication quant à l'agressivité de la tumeur. Il est déterminé par analyse histologique qui permet d'évaluer le degré de différenciation des cellules tumorales, la forme du noyau et le nombre de cellules en division (index mitotique). Le grade a une valeur pronostique mais également prédictive de la réponse à certains traitements.

Des différences nettes entre les tumeurs de patientes sont mises en évidence par ces classifications anatomopathologiques mais l'ampleur de l'hétérogénéité inter-tumorale ne peut véritablement être appréciée que grâce aux analyses moléculaires de ces tumeurs.

1.3.2 Classifications sur critères moléculaires.

Jusqu'à la fin des années 90, les classifications du cancer du sein étaient basées uniquement sur les données cliniques et histologiques. Les progrès techniques réalisés en transcriptomiques et génomiques ont permis l'émergence de nouvelles classifications moléculaires.

Ainsi, en 2000, Perou et al. ont caractérisé les profils d'expression géniques de 42 patientes en utilisant des microarrays d'ADN complémentaires (ADNc) (Perou et al., 2000). Cette analyse a permis de classer ces tumeurs en quatre sous-types :

- les tumeurs exprimant le récepteur aux estrogènes (RE α +) et caractérisées par une forte expression des gènes exprimés dans les cellules luminales de l'épithélium mammaire (**Luminal like**).
- les tumeurs n'exprimant pas le récepteur aux estrogènes (RE-) et exprimant des gènes des cellules basales de l'épithélium mammaire (**Basal Like**)
- les tumeurs présentant une surexpression du gène codant pour le récepteur de type 2 à l'EGF (**HER2**) et également associées à une faible expression du récepteur aux estrogènes.
- les tumeurs associées à une forte expression de gènes caractéristiques des cellules stromales (**Normal like**).

D'autres études menées sur un plus grand nombre de tumeurs ont confirmé et affiné cette classification (Sorlie et al., 2001; Sorlie et al, 2003). Ainsi, le groupe RE+/luminal est divisé en luminal A, B et C selon leur niveau d'expression du RE et de différenciation. De plus, elles affirment la pertinence clinique de cette classification en montrant qu'à chaque sous-groupe sont associées des courbes de survie des patientes différentes. Ainsi, les tumeurs RE+ sont généralement associées à de bons pronostics cliniques contrairement aux tumeurs RE- qui sont souvent de haut grade, peu différenciées et associées à de plus mauvais pronostics (**Tableau I**).

Plus récemment, deux nouveaux sous-groupes ont été identifiés: les tumeurs Claudin-low et apocrines. Les tumeurs Claudin-low présentent un faible niveau d'expression des gènes

impliqués dans les jonctions inter-cellulaire et une forte expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Herschkowitz et al., 2007 ; Prat et al., 2010). Les tumeurs apocrines sont caractérisées par l'expression du récepteur aux androgènes et l'absence d'expression du récepteur à l'estrogène (Farmer et al., 2005).

Cette classification moléculaire des cancers du sein basée sur l'expression génique permet d'appréhender la grande complexité de cette pathologie et ouvre la porte vers une meilleure compréhension de la tumorigénèse mammaire. Cependant, en France, l'analyse transcriptomique n'est pas encore utilisée en routine clinique pour différencier les tumeurs mammaires des patientes. Ainsi, les oncologues utilisent principalement le marquage immunohistochimique des récepteurs hormonaux (RH) à l'estrogène (RE) et à la progestérone (RP) et le récepteur HER2 pour orienter la prise en charge thérapeutique (Haute autorité de Santé, Guide pour le cancer du sein, 2010).

Environ 70% des tumeurs mammaires sont RE+. Les tumeurs sont considérées RE+ lorsque plus de 10% des cellules tumorales expriment le récepteur à l'estrogène. L'analyse du récepteur à la progestérone permet de vérifier la fonctionnalité du récepteur à l'estrogène qui régule positivement l'expression du récepteur à la progestérone.

Environ 15% des cancers du sein surexpriment le récepteur HER2. Ils peuvent présenter également une surexpression des récepteurs hormonaux.

Enfin, 15 à 20% des tumeurs sont dites triple-négatives car elles n'expriment ni le récepteur à la progestérone, ni celui aux estrogènes, ni le HER2.

Sous-type moléculaire	Fréquence*	Caractéristiques Moléculaires	Clinique
Luminal A	19-39%	-forte expression des récepteurs hormonaux -expriment des marqueurs de différenciation luminale : CK8, CK18, GATA3.	Bas grade Bon pronostic
Luminal B	10-23%	-expression intermédiaire des récepteurs hormonaux -surexpression de Her2 -moins différenciés et plus prolifératifs que le type A	Grade intermédiaire Pronostic intermédiaire
Her2+	4-10%	-Amplification/surexpression gène Her2 -Mutation de p53 fréquente	Haut grade Pronostic intermédiaire
Basal like	16-37%	-absence ou faible niveau d'expression des récepteurs hormonaux (RE-PR-) -pas de surexpression du HER2 -expriment les marqueurs de différenciation basale : CK5, CK17 -mutations fréquentes : BRCA1, p53	Haut grade Mauvais pronostic

Tableau I. D'après Hergueta-Redondo et al., 2008 et Rivenbark et al., 2013

**les fréquences des sous-types moléculaires sont variables d'une étude à l'autre.*

1.4 Thérapies des cancers du sein

La prise en charge thérapeutique principale des cancers du sein repose sur la chirurgie complétée au besoin d'une radiothérapie afin de retirer la tumeur primaire et d'éliminer le plus de cellules cancéreuses possible.

Selon la classification anatomopathologique et moléculaire du cancer du sein de la patiente, l'intervention chirurgicale peut être associée à des traitements par chimiothérapies cytotoxiques ciblant de façon large la prolifération cellulaire (principalement des molécules de la famille des anthracyclines et taxanes) et/ou des thérapies plus ciblées telle que les hormonothérapies et/ou une thérapie ciblée anti-HER2.

1.4.1 Thérapie ciblée anti-HER2.

En 1985, King et collègues montrèrent que le gène récepteur Her2 était amplifié dans une lignée cellulaire de cancer du sein (King et al, 1985). Deux ans plus tard, son importance dans la progression tumorale mammaire fut démontrée (Slamon et al, 1987). Depuis, les mécanismes de ce contrôle ont été en grande partie élucidés : la signalisation HER2 promeut la prolifération cellulaire via la voie RAS-MAPK et inhibe la mort cellulaire via la voie phosphatidylinositol 3'-kinase–AKT–mTOR (Gutierrez and Schiff, 2011). Ces découvertes ont permis l'émergence d'une nouvelle thérapie ciblée sous la forme d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie externe du récepteur Her2 (Trastuzumab). L'efficacité de ce traitement combiné aux chimiothérapies classiques pour les patientes présentant une surexpression HER2 a été démontrée par plusieurs essais cliniques avec une nette amélioration de la survie sans récurrence, de la survie globale et une réduction du risque de rechute (Smith et al., 2007 ; Romond et al., 2005 ; **Figure 3**).

Ainsi, le Trastuzumab fut la première thérapie ciblée autorisée en France en 2000 et est aujourd'hui utilisée en routine pour traiter les patientes présentant une surexpression HER2. Le pronostic de ces patientes a été nettement amélioré par l'utilisation de cette nouvelle thérapie ciblée.

Son mode d'action n'est pas entièrement connu. Il semblerait que la liaison de l'anticorps au récepteur induise son internalisation aboutissant à une inhibition des voies en aval de Her2 ce qui provoquerait un arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose. Des données d'expériences *in vivo* suggèrent également que l'efficacité du Trastuzumab serait en partie liée à une induction de réponses immunitaires.

Il est à noter que des résistances à cette thérapie sont relativement fréquentes tout particulièrement chez les patientes présentant un cancer du sein métastatique. La compréhension de ces phénomènes de résistances est un des enjeux majeurs de la recherche contre le cancer du sein (Nahta et al., 2006).

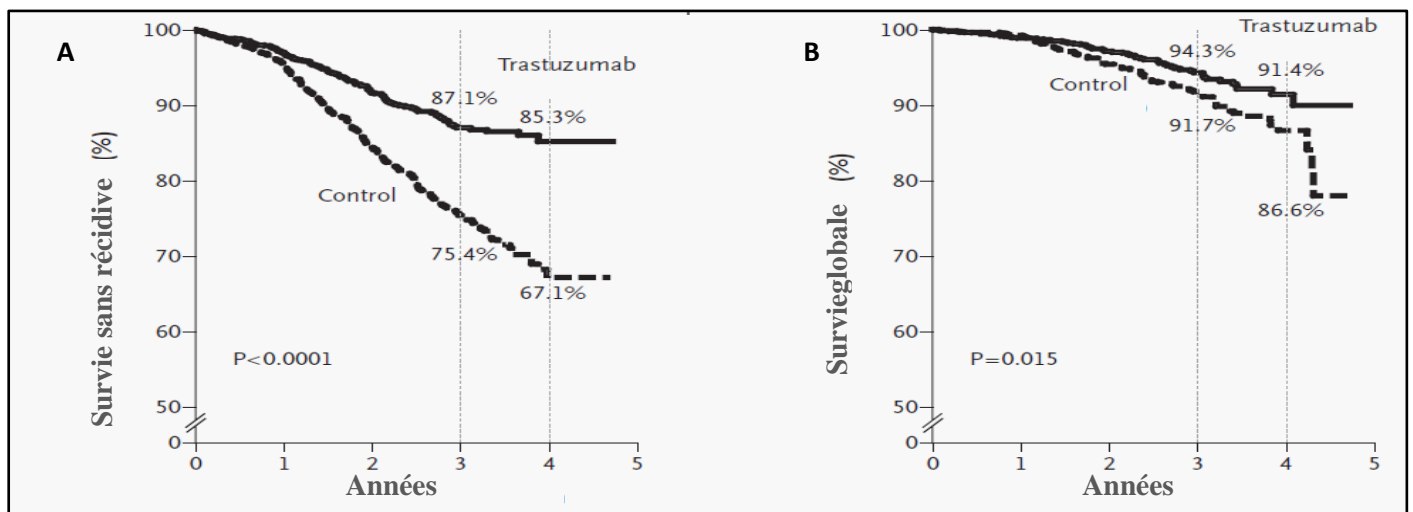


Figure 3. Effet du Trastuzumab sur la survie sans récurrence (A) et globale (B).

Le groupe contrôle correspond à 1679 patientes HER2+ traitées uniquement par chimiothérapies cytotoxiques, le groupe Trastuzumab correspond à 1672 patientes HER2+ traitées par chimiothérapies et Trastuzumab (Romond et al, 2005).

1.4.2. Hormonothérapies.

L'hormonothérapie est bien antérieure à la thérapie ciblée anti-HER2 puisque l'on peut considérer que, fin XIXe, le chirurgien écossais Thomas Beatson la pratiquait déjà en retirant chirurgicalement les ovaires de patientes atteintes de cancer du sein, ayant constaté que cette opération aboutissait à une régression de la tumeur. L'identification du récepteur à l'œstrogène a permis de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette observation et de développer des thérapies permettant d'éviter l'ovariectomie (Jensen et al., 1973, Heldring et al., 2007).

Il existe deux récepteurs à l'œstrogène, RE- α et RE- β , exprimés dans de nombreux tissus (glande mammaire, utérus, os, système cardio-vasculaire, cerveau). Le mode d'action classiquement décrit est le suivant: après liaison de l'œstrogène, les RE sont transloqués dans le compartiment nucléaire et sont capables de se lier à l'ADN influençant ainsi l'expression de certains gènes, différents pour chacun des deux récepteurs. Le RE α est essentiel au développement de la glande mammaire et est celui surexprimé dans les cancers du sein. Les effets positifs des estrogènes sur la prolifération tumorale lui ont été attribués.

En hormonothérapie, deux stratégies sont principalement utilisées pour bloquer la signalisation ostrogénique : l'utilisation d'un antagoniste du récepteur aux œstrogènes (comme le Tamoxifène) ou une inhibition de la synthèse des œstrogènes par l'utilisation d'inhibiteurs d'aromatase. L'efficacité de ces thérapies a été démontrée puisqu'elles prolongent la survie sans récurrence et réduisent la mortalité (Heldring et al, 2007).

Les hormonothérapies et la thérapie ciblée anti-HER2 ont révolutionné la prise en charge thérapeutique des cancers du sein et ont contribué à en diminuer la mortalité. Un sous-type de cancer, le cancer du sein triple-négatif (CSTN), n'a pas pu bénéficier de ces avancées thérapeutiques étant donné que ses cellules tumorales n'expriment par définition pas les récepteurs hormonaux ou le HER2.

1.5. Les cancers du sein triple-négatifs.

1.5.1 Définition.

Le terme CSTN a été utilisé pour la première fois en 2005 pour caractériser un sous-groupe de patientes atteintes de cancer du sein pour qui la chimiothérapie était la seule option en l'absence d'expression du RE, RP et HER2. Actuellement, le cancer du sein triple-négatif est défini comme un sous-groupe hétérogène de cancers du sein invasifs caractérisés par l'absence d'expression du RE, RP et l'absence de surexpression du HER2.

Entre 15 et 20% des cancers du sein diagnostiqués sont triple-négatifs, ce pourcentage variant selon les seuils utilisés pour définir la positivité aux récepteurs hormonaux et les méthodes de détection de l'amplification de l' HER2 (Immunohistochimie ou FISH). En comparaison aux autres sous-types de cancers du sein, leur prévalence est plus importante chez les femmes non ménopausées de moins de cinquante ans, les femmes d'origine africaine et hispano-américaine et les femmes porteuses de mutations germinales sur le gène *BRCA1* (Kalimutho et al., 2015) .

1.5.2 Caractéristiques.

Au diagnostic, ce sont généralement des adénocarcinomes invasifs canaux de haut grade (77-90% des CSTN sont de grade 3) et très rarement *in situ*, suggérant une progression rapide des CSTN vers une forme de cancer invasif. Ils sont caractérisés par un faible niveau de différenciation, un taux de prolifération élevé et des tumeurs de grande taille. Ils ont tendance à se disséminer dans les poumons et le cerveau contrairement aux autres sous types de cancer du sein qui forment plutôt des métastases osseuses et au sein des tissus mous (**Figure 4.**). La survie à 5 ans des patientes CSTN est estimée à 70% soit un taux inférieur à celui des autres sous types présentent 80% de survie à 5 ans (**Figure 5**). De plus, le taux de rechutes à 5 ans est supérieur pour les CSTN que les autres sous-types de cancers du sein (**Figure 6.**).

Concernant son appartenance aux sous-groupes définis par Pérou et al., bien que les termes cancers du sein triple-négatifs ou basal-like soient parfois utilisés comme synonymes, la correspondance n'est pas parfaite puisque un maximum de 70% des CSTN, définis par l'absence d'expression de trois protéines, sont des cancers du sein « basal like », définis par l'expression ARNm d'environ 500 gènes (Rakha and Ellis, 2009). De plus, même si la plupart des cancers du sein ayant un profil d'expression génique basal-like sont CSTN environ 5% d'entre eux sont RE-positifs et entre 6 et 35% surexpriment HER2 (Carey et al., 2010 ; Nielsen et al., 2004)

Ainsi, les CSTN et les cancers du sein « basal like » sont considérés comme des catégories distinctes mais chevauchantes présentant de nombreux points communs.

Les sous types Claudin-low sont également triple négatifs. De plus, les tumeurs de patientes porteuses de mutations germinales dans le gène codant pour la protéine BRCA1, impliquée dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, sont le plus souvent triple-négatives (60-90% des cas ; Rahka et al., 2012).

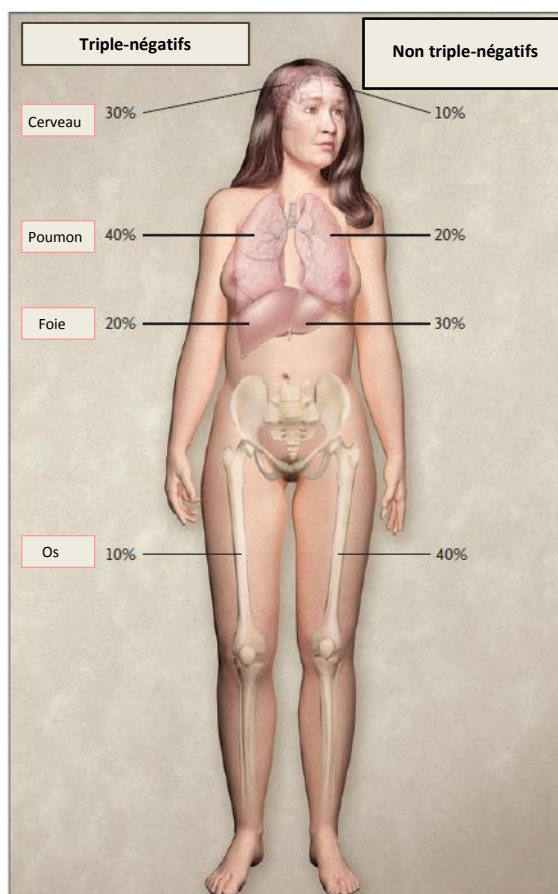


Figure 4. Sites de rechutes métastatiques dans les cancers du sein triple-négatifs et non triple-négatifs. Les pourcentages représentent la proportion approximative de femmes avec métastases. D'après Foulkes et al., 2010

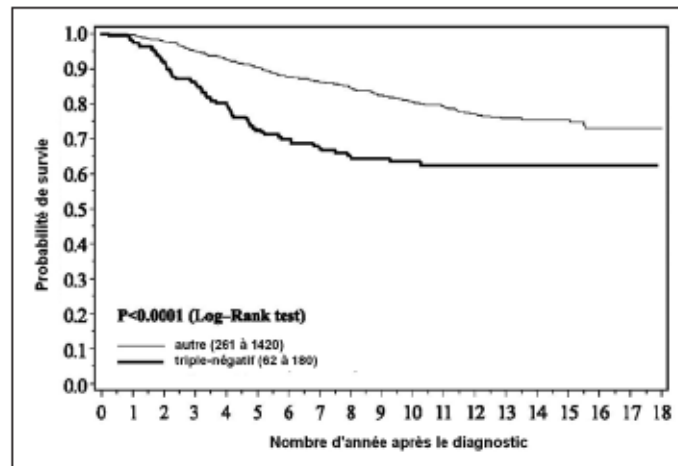


Figure 5. Probabilité de survie des patientes de cancer du sein triple-négatifs comparativement aux patientes d'autres types de cancers du sein (issu de Frere et al., 2010 depuis une étude de Dent et al., 2007)

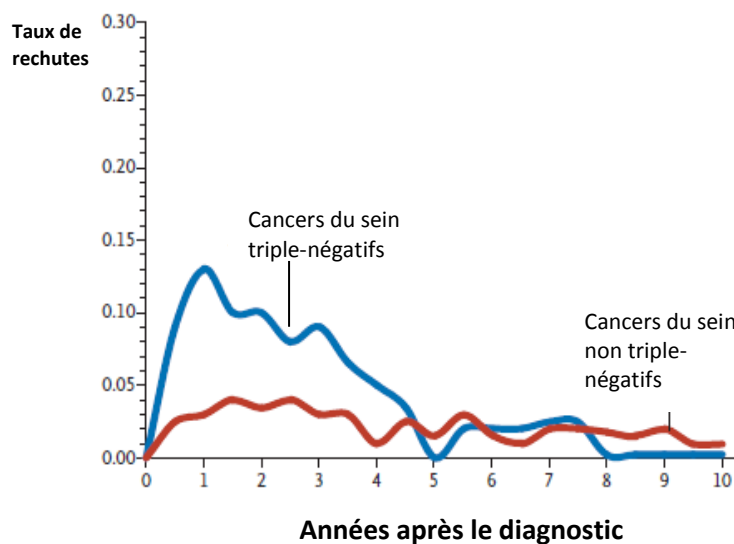


Figure 6. Taux de rechutes métastatiques des patientes de cancer du sein triple-négatifs comparativement aux patientes d'autres types de cancers du sein (issu de Foulkes et al., 2010, à partir d'une étude de Dent et al., 2007)

La plupart des CSTN expriment des protéines caractéristiques des cellules épithéliales basales de la glande mammaire (CK5, CK17), le récepteur EGFR, la P-cadherine et la

vimentine et présentent fréquemment une mutation somatique de TP53 et PIK3CA (8 et 10% respectivement). Les CSTN sont caractérisés par un degré d'instabilité génétique supérieur à celui des autres sous types de cancers du sein. Aussi, une grande proportion de CSTN présente un nombre élevé de mutations affectant de nombreuses voies de signalisation différentes. Cette instabilité explique en partie leur grande hétérogénéité inter- et intra-tumorale (Pareja et al., 2016). Ainsi, l'analyse des profils d'expression génique de 587 tumeurs triple-négatives a permis en 2011 à Lehmann et al. de sous diviser les cancers du sein triple négatifs en 6 sous-groupes associés à des réponses thérapeutiques distinctes (présentés dans le **tableau 2** ; Lehmann et al., 2011).

La prise en compte de ces sous-groupes pourrait être déterminante dans la recherche et le développement de nouvelles thérapies. Au-delà de ces données transcriptomiques, l'émergence d'approches protéomiques pourrait s'avérer cruciale dans la compréhension des CSTN. Ainsi, Hochgrafe et al. ont étudié par spectrométrie de masse les profils de phosphorylations sur tyrosines de tumeurs lumineales ou basales. Ils montrent que les tumeurs basales présentent de nombreuses protéines avec un plus fort niveau de phosphorylations telles que les kinases de la famille Src, EGFR ou FAK, la kinase des adhérences focales (Hochgrafe et al .,2010 ; Kalimutho et al.,2015).

Sous-groupe de CSTN	Caractéristiques	Réponse thérapeutique
Basal-like 1	Forte expression de gènes régulant le cycle cellulaire et impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN	Bonne réponse aux chimiothérapies cytotoxiques
Basal-like 2	Forte expression de gènes régulant la prolifération, la signalisation des récepteurs tyrosine kinases et métaboliques	Faible réponse aux chimiothérapies cytotoxiques
Mesenchymal	Forte expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans la signalisation de facteurs de croissance	Réponse aux chimiothérapies cytotoxiques intermédiaires Sensibles aux inhibiteurs de Src et mTOR (lignées cellulaires)
Mesenchymal stem-like	Forte expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse Faible expression de gènes régulant la prolifération Surexpression du TGF β	Réponse aux chimiothérapies cytotoxiques intermédiaires
Luminal androgen receptor expression	Forte expression de gènes impliqués dans la signalisation du récepteur aux androgènes	Faible réponse aux chimiothérapies cytotoxiques
Immunomodulatory	Forte expression de gènes impliqués dans la signalisation immunitaire	Réponse aux chimiothérapies cytotoxiques intermédiaires

Tableau 2. Les six sous-groupes de TNBC définis par les travaux de Lehmann et al., 2011

1.5.3. Options thérapeutiques.

A l'heure actuelle, les options thérapeutiques pour les patientes atteintes de CSTN sont limitées.

Après la chirurgie, la chimiothérapie cytotoxique (anthracyclines et taxanes) est la base du traitement contre les CSTN. De par leur fort taux de prolifération, ces tumeurs sont souvent initialement sensibles aux chimiothérapies. Cependant, les patientes présentant des CSTN plus avancés répondent mal aux chimiothérapies. De surcroît, les taux de rechutes à cinq ans des CSTN sont plus élevés que pour les autres sous types de cancers du sein. Ceci explique en partie le taux de survie à cinq ans inférieur des CSTN (**Figure 5**) et souligne la nécessité de développement de nouvelles thérapies ciblées contre ces cancers. De nombreuses pistes sont explorées à l'heure actuelle sans succès établi. Certaines sont tout de même prometteuses, telles que les inhibiteurs de PARP (Poly-ADP Ribose Polymérase) qui seraient efficaces pour les patientes présentant une mutation ou une inactivation de la protéine BRCA1 (Kalimutho et al., 2015). De même, les résultats d'essais cliniques utilisant des molécules ciblant les récepteurs VEGF et PDGF fortement exprimés dans les tumeurs mammaires semblent encourageants (Ganesan et al., 2014). Le ciblage de la voie PI3K, suractivée chez 60% des patients CSTN pourrait également être intéressant d'après les résultats de plusieurs essais cliniques indépendants (Kalimutho et al., 2015 ; Ganesan et al., 2014).

Cependant, ce qu'il ressort de ces nombreux essais cliniques contre les CSTN est la capacité des cellules tumorales à développer des résistances aux thérapies mises en place. Ces résistances peuvent, entre-autres, être le résultat de l'hétérogénéité intra-tumorale mais également de la redondance des voies de signalisations permettant de contourner l'inhibition (Yap et al., 2013). Ce constat suggère qu'il serait pertinent de développer des thérapies combinant plusieurs thérapies ciblées.

De même, il souligne de nouveau la nécessité d'une meilleure compréhension de la biologie des CSTN et notamment de la complexité de leurs voies de signalisation.

1.6. Conclusions du chapitre I.

Le cancer du sein apparaît comme une maladie complexe caractérisée par une grande hétérogénéité inter- et intra-tumorale. Aussi, des classifications sont utilisées pour définir différents sous -types de cancer du sein et orienter la prise en charge thérapeutique. Ainsi, les patientes présentant un cancer du sein avec forte expression du RE ou du HER2 peuvent bénéficier d'hormonothérapies ou de thérapie ciblée contre le HER2, des traitements qui ont nettement amélioré le pronostic de ces patientes. Les cancers du sein triple-négatifs restent en marge de ces progrès, la seule option thérapeutique étant pour ces cancers les chimiothérapies cytotoxiques qui ne parviennent pas toujours à empêcher leur dissémination métastatique. Ainsi, il paraît urgent d'essayer de mieux comprendre la biologie des CSTN et notamment les mécanismes leur attribuant ces capacités invasives.

Chapitre II : L'invasion.

2.1 . Généralités.

L'invasion cellulaire peut être définie comme la capacité des cellules à migrer au travers d'une matrice extracellulaire (Polacheck et al., 2013).

Dans des conditions physiologiques, c'est un processus observé durant le développement et également nécessaire aux réponses immunitaires. En physiopathologie, l'invasion est une étape clé de la cascade métastatique. Les cellules de carcinomes passent par différentes étapes pour quitter la tumeur primaire et coloniser des organes à distance: 1) le détachement des cellules de la tumeur primaire, 2) l'invasion au travers la lame basale et la pénétration dans le stroma environnant 3) l'invasion de la lame basale et des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques (l'intravasation), 4) la survie dans la circulation sanguine, 5) l'adhérence aux capillaires de l'organe cible et l'invasion au travers de la lame basale et les cellules endothéliales (extravasation) et enfin, 6) la croissance au sein du nouvel organe. Pour passer chacune de ces étapes, les cellules se heurtent à de nombreuses barrières naturelles. Ainsi, la formation de métastases est un processus particulièrement inefficace, puisqu'il est estimé que plus de 99.98% des cellules tumorales disséminées meurent avant qu'une métastase ne se forme (Valastyan and Weinberg, 2011 ; Jin and Mu, 2015 ; **Figure 7**).

Dans cette cascade, il apparaît que l'invasion est bien une étape essentielle puisqu'elle permet aux cellules tumorales de s'échapper de la tumeur primaire qui est confinée derrière la lame basale épithéliale, de migrer jusqu'aux vaisseaux et d'entrer et sortir de la circulation.

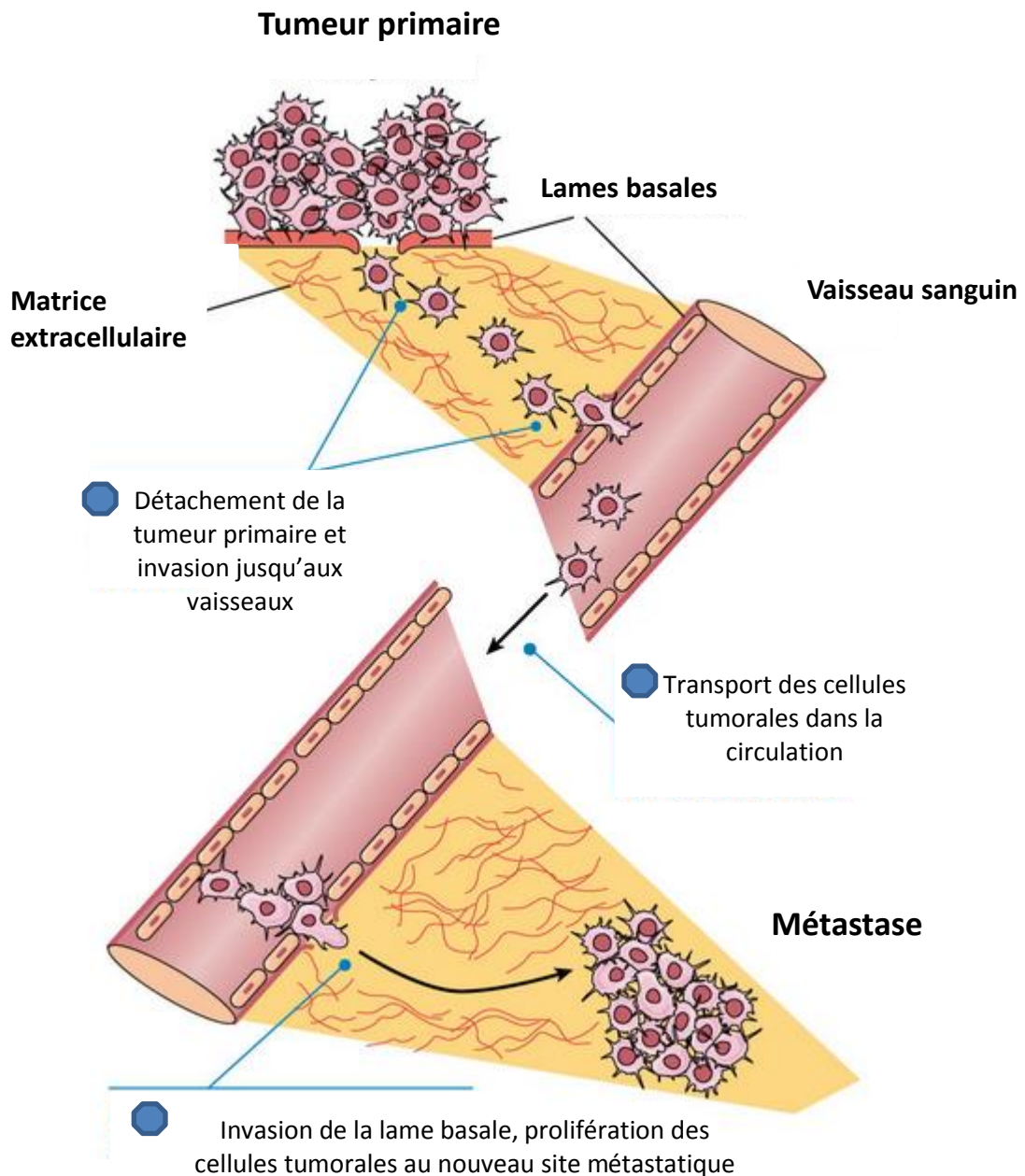


Figure 7. L'invasion dans le modèle de la cascade métastatique.

Durant la cascade métastatique, les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire, envahissent la lame basale entourant la tumeur et migrent au sein de la MEC jusqu'aux vaisseaux qu'elles pénètrent en envahissant la lame basale vasculaire. Les cellules qui survivent dans la circulation, s'accrochent à la paroi des vaisseaux pour en sortir en envahissant de nouveau la lame basale vasculaire. Les cellules se retrouvent dans un nouvel environnement auquel elles doivent s'adapter pour survivre et proliférer, formant ainsi des métastases.

La formation de métastases est un processus particulièrement inefficace, puisqu'il est estimé que plus de 99.98% des cellules tumorales disséminées meurent avant qu'une métastase ne se forme. Adapté de Pearson Education, <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-24/CB24.html>

L'invasion est un processus particulièrement flexible, influencé par de nombreux facteurs propres à la cellule en migration mais aussi à l'environnement qu'elle traverse. En effet, il est important de noter que l'invasion des cellules tumorales semble être fortement régulée par le microenvironnement tumoral (Brábek et al., 2010) . Cependant, cet élément étant particulièrement complexe et n'étant pas directement l'objet de ma thèse, je me suis principalement focalisée dans ce chapitre sur les propriétés intrinsèques aux cellules tumorales.

L'invasion repose grandement sur la capacité des cellules tumorales à migrer de façon directionnelle. La directionnalité peut être établie par des gradients de facteurs de croissance, de chimiokines ou des restrictions physiques orientant la direction du mouvement en participant à la polarisation des cellules en migration et à la définition d'un front de migration dirigé dans la direction du mouvement (Petrie et al., 2009).

Les études anatomo-pathologiques de tumeurs humaines, *in vivo* de microscopie intravitale chez la souris mais aussi *in vitro* de lignées cellulaires, ont permis de révéler que les cellules tumorales adoptent différents modes de migration selon le type tumoral dont elles sont issues mais aussi l'environnement qu'elles traversent (Clark et al. 2015). Les cellules tumorales utilisent les mêmes types de mécanismes de migration que les cellules non tumorales. Elles peuvent migrer de façon individuelle en absence des jonctions cellule/cellule ou collectivement, en groupe multicellulaire lorsque les adhérences cellules/cellules sont maintenues. Les cellules migrant individuellement peuvent utiliser deux modes de migration distincts: la migration mésenchymateuse, dépendante des intégrines et des protéases ou la migration amiboïde, indépendante des intégrines et des protéases (Valastyan et al., 2011 ; **Figure 8**).

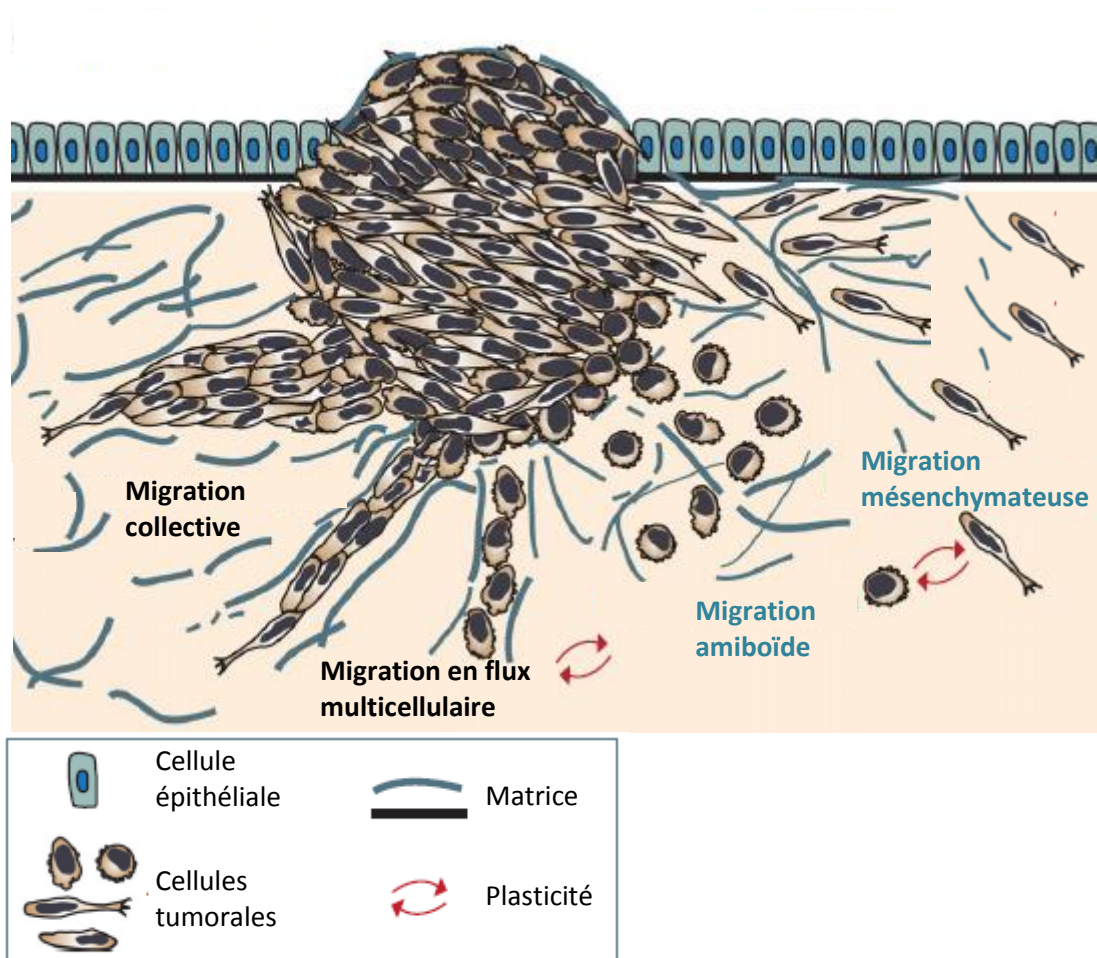


Figure 8. Modes de migration lors de l'invasion tumorale.

Les cellules tumorales adoptent différents types de migration lors de l'invasion. Ce mode de migration peut être défini par des caractéristiques propres à la cellule tumorale mais également à l'environnement tumoral. Ainsi, les cellules tumorales peuvent changer de mode de migration (plasticité). D'après Pandya et al., 2016.

2.2. Les différents modes de migration.

2.2.1 La migration amiboïde.

Les cellules adoptant une migration amiboïde sont caractérisées par une forme arrondie, une grande capacité de déformation liée à une forte contractilité cellulaire et à une faible adhérence au substrat. Elles se déplacent rapidement (15µm/min) en alternant des phases d'expansion/contraction et il a été montré qu'elles ne reposent pas sur l'activité de protéases permettant de dégrader la matrice extracellulaire (Wolf et al., 2003). En effet, leur grande contractilité leur permet de pousser les fibres de la matrice et de se faufiler dans les espaces libres (Wyckoff et al., 2006). Cette contractilité est permise par un épais réseau d'acto-myosine corticale qui a été observé *in vitro* et *in vivo*. Les modèles *in vitro* ont permis de montrer que la contraction de ce réseau d'acto-myosine est permise par les kinases de Rho, ROCK1 et ROCK2 dont les activités sont nécessaires à la phosphorylation de la myosine qui est incorporée dans les filaments d'actine pour induire la contraction (Pinner et Sahai, 2008). La contraction provoquée par ROCK induit la formation de protrusions de type « bleb ». La migration amiboïde ne peut avoir lieu au sein de matrices extracellulaires trop rigides, les cellules ne pouvant alors générer suffisamment de force pour déplacer les fibres de matrice, la dégradation de celle-ci par des protéases est alors nécessaire à leur invasion. Concernant l'adhérence au substrat, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la migration amiboïde des lymphocytes et des neutrophiles était en partie ou complètement indépendante des adhérences médiées par les intégrines (Friedl et al., 2003).

La migration amiboïde a été principalement observée sur des leucocytes (neutrophiles, lymphocytes et cellules dendritiques) dans des conditions physiologiques, et des cellules tumorales de leucémies, de lymphomes et de carcinomes pulmonaires à petites cellules (Friedl et al., 2003; Friedl et al., 2011; Pinner and Sahai, 2008). Dans le cancer du sein, une migration de type amiboïde a été observée sur des cellules de carcinomes mammaires de rat, *in vitro* lors de l'invasion tridimensionnelle de matrice extracellulaire ou *in vivo*, après injection dans les coussinets adipeux mammaires de souris. Ils montrent bien que cette migration est dépendante de ROCK mais non des protéases de dégradation de la matrice, les MMPs (Wyckoff et al., 2006).

2.2.2. La migration mésenchymateuse.

Les cellules adoptant une migration mésenchymateuse sont caractérisées par une morphologie allongée en fuseau, de type mésenchymateuse qui dépend de la dynamique d'adhérences des intégrines à la matrice extracellulaire et d'importantes forces de traction. L'activation des protéases est nécessaire au maintien du phénotype migratoire mésenchymateux (Friedl et al., 2011).

2.2.2.1 . La transition épithélio-mésenchymateuse.

Ce mode de migration est principalement observé sur des cellules tumorales issues de cellules du stroma (fibrosarcomes et gliomes) ou de cancers épithéliaux après un programme de dédifférenciation: la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Durant la TEM, la signalisation de facteurs de croissance du stroma tumoral tels que le TGF β , le FGF ou l'EGF aboutit à l'activation de facteurs de transcription, notamment ZEB1, Twist et Snail 1/ 2 qui inhibent directement ou indirectement la transcription du gène de la E-Cadhérine, une protéine des jonctions cellule/cellule, précisément des jonctions adhérentes. Ainsi, les cellules perdent ou affaiblissent leurs jonctions cellules/cellules. Ceci résulte en une perturbation de la polarité apico-basale (Friedl et al., 2011). En parallèle, de cette perte des caractéristiques épithéliales, une augmentation des marqueurs mésenchymateux est observée, telle que la N-Cadherine, la fibronectine et la vimentine ainsi qu'une augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules tumorales (Bill et al., 2015). *In vitro*, la TEM peut facilement être induite sur des cellules de cancer du sein en culture via le TGF β ou la surexpression de Twist. Sur des tumeurs de patients, la détection par analyse histo-pathologique de cellules tumorales ayant subi une TEM et migrant individuellement est compliquée de par la difficulté qu'il y a à les distinguer des fibroblastes du stroma (Bill et al., 2015). Cependant, des cellules tumorales circulantes de patientes de cancer du sein exprimant des marqueurs de TEM (Twist et vimentine) ont été identifiées (Kallergi et al., 2011). L'utilisation de modèles de cancers du sein de souris transgéniques a permis de montrer que la TEM existe *in vivo*. Ainsi, Trimboli et al., en marquant génétiquement des cellules tumorales mammaires et analysant ces cellules par immunofluorescence, ont identifiés des cellules tumorales présentant une perte de la E-Cadherine et un gain d'expression de la fibronectine (Trimboli et al., 2008).

2.2.2.2. Le modèle cyclique de la migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est un processus cyclique comprenant 5 étapes (Friedl et al., 2003 ; Friedl et al., 2011 ; **Figure 9**).

1. La première étape consiste en une polarisation du cytosquelette par la polymérisation de l'actine qui en poussant sur la membrane plasmique va permettre la formation d'une protrusion au front de migration. Cette protrusion est dirigée vers des zones plus concentrées en chimioattractants, facteurs de croissance ou autre ligands extracellulaires. La formation de cette protrusion implique la formation de phosphoinositides au front de migration permettant la liaison de facteurs contrôlant la polymérisation de l'actine, tels que les GEF régulant les Rho GTPases, Arp2/3 et WASP (*voir la sous partie sur les protrusions pour plus de détails*).

2. À la deuxième étape, cette protrusion va s'accrocher à la matrice extracellulaire, en particulier via les intégrines, des récepteurs de surface qui se lient à la matrice et forment des clusters à la membrane. S'en suit le recrutement de protéines adaptatrices aux domaines intracellulaires des intégrines telles que la kinase des adhérences focales (FAK) ou la taline. Ces protéines peuvent elles-mêmes se lier à des protéines liant l'actine comme la vinculine et la paxilline et des protéines de signalisation régulatrices comme les Rho GTPases ou Src. Ces interactions permettent ainsi la liaison des complexes d'intégrines au cytosquelette d'actine et la génération de forces ainsi que l'activation de voies de signalisation qui auront pour conséquence, entre autre, le renforcement de la protrusion et des complexes d'adhérences.

3. Durant la troisième étape, quelques micromètres derrière le front de migration, des protéases de surface se concentrent près des sites d'adhérence au substrat. Ces protéases clivent à proximité de la surface cellulaire des composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibronectine et la laminine, mais également les pro-MMPs les rendant ainsi solubles.

4. Durant la quatrième étape, la myosine II active se lie au filament d'actine et permet la contraction du réseau d'acto-myosine. L'activation de la myosine est permise par la petite Rho-GTPase Rho.

5. Suite à la contraction de la cellule, le détachement de l'arrière du corps de la cellule via le désassemblage des adhérences matrice/cellule constitue la cinquième étape (Friedl et al., 2003 ; Friedl et al., 2011).

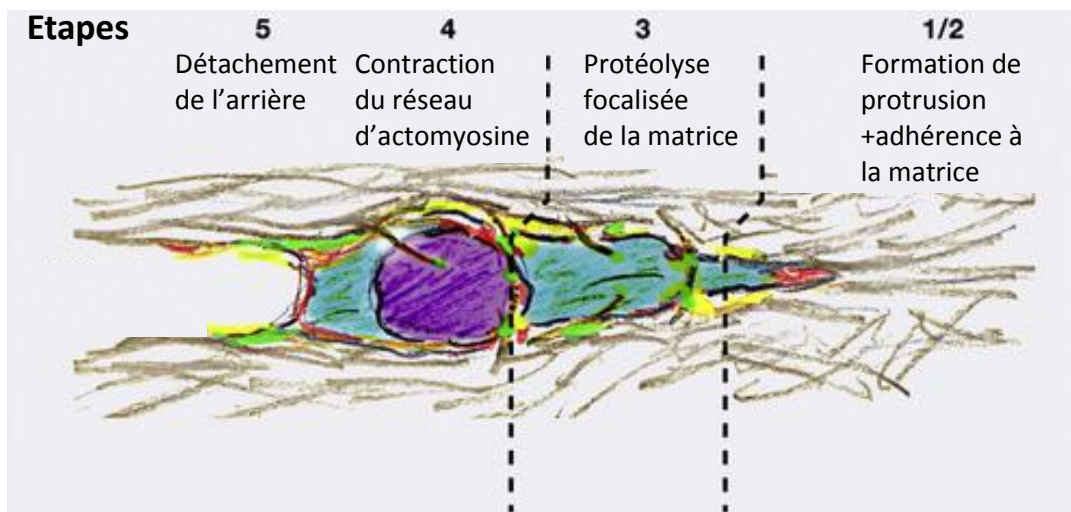


Figure 9. Modèle cyclique en 5 étapes de la migration mésenchymateuse.
D'après Friedl et al., 2011.

2.2.3. La migration collective.

La migration collective est caractérisée par le mouvement simultané d'un groupe de cellules et implique que les cellules migrantes maintiennent leurs jonctions cellule/cellule (Bill et al., 2015). Avec une vitesse de migration de 0.01-0.05µm/min, c'est le mode de migration le plus lent (Clark et al., 2015). En physiologie, la migration collective est essentielle au développement embryonnaire de nombreux organismes mais également aux processus de comblement de blessure. Elle est aussi impliquée dans le développement normal de la

glande mammaire (Friedl et al., 2003). En histopathologie, la migration collective est le mode de migration le plus observé dans de nombreux cancers, dont ceux du sein (Friedl et al., 2012) .

Les mécanismes à la base de la migration collective ne sont pas entièrement élucidés. Les connaissances que nous avons à ce propos, nous viennent de son étude *in vivo* dans de petits organismes modèles tels que l'ovaire de drosophile et la migration des cellules de bordures mais également de modèles murins d'invasion tumorale. *In vitro*, elle peut être étudiée lors d'expériences de comblement de blessure menées sur des lignées tumorales en culture ou par la formation d'organoïdes en 3 dimensions (3D).

Tout comme pour la migration individuelle, la migration collective nécessite la polymérisation et la contractilité du cytosquelette d'actomyosine couplée à une polarité cellulaire. Cependant, dans la migration collective, ces phénomènes (cytosquelette, voie de signalisation) sont coordonnés de façon « supra-cellulaire », coordination permise par les jonctions cellule/cellule (Friedl et al., 2011). Parmi ces interactions, les jonctions adhérentes seraient essentielles à la cohésion du groupe en permettant une certaine continuité entre les cytosquelettes des cellules. En effet, les cadhérines, les composants transmembranaires principaux de ces adhérences, permettent en liant les caténines qui interagissent avec l'actine de relier les cytosquelettes de deux cellules voisines (Mayor et al. 2016).

Dans la plupart des cas de migration collective, il existe une hiérarchie dans le groupe de cellules en migration. Ainsi, les cellules à l'avant du groupe sont appelées cellules « leader ».

La fonction de ces cellules leaders est de sonder l'environnement et de dicter la direction de la migration à l'ensemble du groupe. Elles génèrent une grande partie des forces de tractions et la dégradation de la matrice nécessaires à la progression du groupe. Pour cela, les cellules leader forment des protrusions riches en actine dans le sens de la migration. Les mécanismes à la base de la formation des protrusions de cellules migrant collectivement seraient similaires à ceux de cellules migrant individuellement avec l'implication des RhoGTPases et des facteurs contrôlant la polymérisation de l'actine tels qu'Arp2/3 (*voir sous-partie sur les protrusions*). D'autres cellules du groupe migratoire à l'arrière des cellules leader peuvent générer des protrusions qui participeraient aussi aux forces de traction nécessaires à la migration (Ilin et al., 2009). La mise en place de forces de traction

nécessite, tout comme pour la migration individuelle, l'attachement du cytosquelette à la matrice extracellulaire, via la formation de complexes d'adhérence médiée par les intégrines. La migration du groupe de cellules nécessite la formation d'espaces dans la matrice de volumes équivalents aux diamètres de plusieurs cellules (Pandya et al., 2016).

2.2.4. Le flux multicellulaire.

Le flux multicellulaire est un mode de migration intermédiaire, entre la migration individuelle et collective (Friedl et al., 2011). Il est caractérisé par des cellules migrant individuellement, les unes derrière les autres, en file indienne. Elles seraient guidées par le même gradient chimiotactique ou par les mêmes structures tissulaires, telles que les fibres de la matrice. Le cytosquelette de chacune des cellules agit indépendamment pour générer les forces de traction nécessaires à la progression mais les cellules peuvent tout de même maintenir des jonctions entre-elles, bien que faibles et transitoires (Friedl et al., 2012). Elles adoptent des phénotypes de migration amiboïde ou mésenchymateuse (Pandya et al., 2016). Physiologiquement, ce mode de migration est utilisé par les cellules de la crête neurale et les myoblastes (Friedl et al., 2003). Ce mode de migration a aussi été observé sur des modèles orthotopiques de cancers du sein et du mélanome. C'est un mode de migration particulièrement rapide avec une vitesse de migration de $1\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl et al., 2012).

2.3. La formation de protrusions

2.3.1. Les lamellipodes

Les lamellipodes décrits pour la première fois sur des lignées de fibroblastes en migration (Abercrombie et al., 1970) sont des protrusions larges et relativement plates ($0.1\text{--}0.2\mu\text{m}$; **Figure 10**). Ils ont été observés dans de nombreux types cellulaires *in vitro*, dont les cellules tumorales mammaires, mais également *in vivo*, sur des cellules migrant individuellement comme les cellules dendritiques migrant sur la paroi des vaisseaux lymphatiques ou collectivement, dans la migration des cellules de bordures chez la Drosophile (Ridley, 2015).

Leur présence est principalement détectée sur des cellules migrant en 2D mais une étude récente suggère que des fibroblastes en culture migrant dans des environnements 3D de matrice reconstituée forment des lamellipodes (Petrie et al., 2012). Cependant, les connaissances que nous avons sur leur structure et leur régulation sont principalement basées sur les résultats d'études de migration de cellules en culture en 2D.

Ainsi, ce sont des structures transitoires suivant des cycles de protrusions et de rétraction. La polymérisation de l'actine fournit la force nécessaire à la projection de la membrane plasmique requise pour la formation du lamellipode. Cette polymérisation est permise par des protéines permettant la nucléation et l'élongation de l'actine. La nucléation est la base et l'étape limitante de la formation de nouveaux filaments d'actine: elle consiste en l'association de trois monomères d'actine globulaires qui forment alors un noyau d'actine filamenteuse dont les extrémités peuvent subir une élongation par ajout de monomères d'actine. La protéine nucléatrice principalement impliquée dans la formation des lamellipodes est le complexe nucléateur Arp2/3 (actin related protein 2/3) qui génère de nouveaux filaments d'actine par branchement sur des filaments d'actine existants. Les protéines permettant l'élongation des filaments d'actine au niveau des lamellipodes sont principalement les formines et les protéines de la famille ENA/VASP (Enabled/vasodilator-stimulated phospho-protein) (Ridley et al., 2011 ; Krause et al., 2014).

Le modèle traditionnellement admis concernant la formation du lamellipode est que celle-ci est contrôlée par la petite RhoGTPase Rac qui est capable d'interagir avec le complexe WAVE et ainsi de réguler la nucléation contrôlée par Arp2/3 (Miki et al., 1998). De même, Rac est capable d'interagir avec plusieurs protéines de la famille des formines mais le lien entre ces interactions et la formation du lamellipode n'est pas établi (Ridley et al., 2015). Cependant, l'utilisation de sondes FRET Rho-GTPases (Fluorescence Resonance Energy Transfer) fournissant une indication spatio-temporelle de leurs activités a permis de montrer que Rac n'était pas la seule Rho GTPase activée au front de migration du lamellipode. Ainsi, plusieurs études ont montré que Rac mais également RhoA et Cdc42 sont fortement activées au sein des lamellipodes dans des fibroblastes (Machacek et al., 2009 ; Itoh et al., 2002). La colocalisation de RhoA avec la formine mDia1 suggérerait que RhoA pourrait également induire la polymérisation de l'actine dans le lamellipode (Kurokawa et al., 2005 ; Fritz et al., 2016 ; Parsons et al., 2010). De même, Zaoui et al., ont montré que RhoA était impliqué dans

la formation de lamellipodes dans des lignées de carcinomes mammaires (SKBR3 et T47D) (Zaoui et al., 2008,).

2.3.2. Les filopodes

Durant la migration, les cellules peuvent former des protrusions fines et allongées au-delà du front de migration du lamellipode: ce sont les filopodes (**Figure 10**). Ils ont été observés *in vitro* sur des cellules tumorales ou non, en 2 et 3 D. *In vivo*, ils ont notamment été retrouvés sur des cellules endothéliales durant les processus d'angiogenèse et également sur de nombreux types de cellules tumorales en migration au sein de matrices extracellulaires, quel que soit leur mode de migration. Des données cliniques suggèrent un rôle des filopodes dans la dissémination métastatique et leur formation est nécessaire à l'invasion des cellules tumorales *in vitro* (Arjonen et al., 2011).

La fonction qui leur est classiquement attribuée est celle d'une exploration de l'environnement (Yang and Svitkina, 2011). Ils pourraient notamment permettre une exploration de la topographie et de la rigidité de la matrice extracellulaire. Ce rôle de senseur de la matrice pourrait être permis par la formation de complexes d'adhérence cellule/matrice extracellulaire intégrines dépendants à la pointe des filopodes (Jacquemet et al., 2015).

Les filopodes sont composés d'actine filamenteuse. Cependant, contrairement aux lamellipodes dont l'actine est organisée en réseau branché, les filopodes présentent une actine organisée en faisceaux serrés parallèles. Cette organisation en faisceaux de l'actine est principalement permise par la fascine qui permet de rassembler les filaments d'actine (Ridley et al., 2011). Des phénomènes de polymérisation de l'actine sont également à la base de la formation du filopodes. Bien que les mécanismes exacts à l'origine de la polymérisation de l'actine nécessaire à la formation du filopodes soient sujets à débat, il semble qu'elle serait surtout permise par des protéines de la famille des formines, telles que les protéines mDia (Diaphanous-related formin) qui permettraient la nucléation et l'élongation des filaments d'actine dans les filopodes (Machesky et al., 2008). La formation

des filopodes est sous le contrôle de la Rho-GTPase Cdc42 (Nobes et al. 1995)) qui contrôlerait la polymérisation de l'actine via un contrôle de mDia2.(Parsons et al., 2008). Les GTPases Rac et Rho pourraient également être impliquées (Ridley et al., 2015). De plus, Pellegrin et al., ont montré dans une lignée de cellules de cancer de l'utérus que la Rho GTPase Rif contrôlait la formation de filopodes via des mécanismes indépendants et distincts de Cdc42 (Pellegrin et al., 2005).

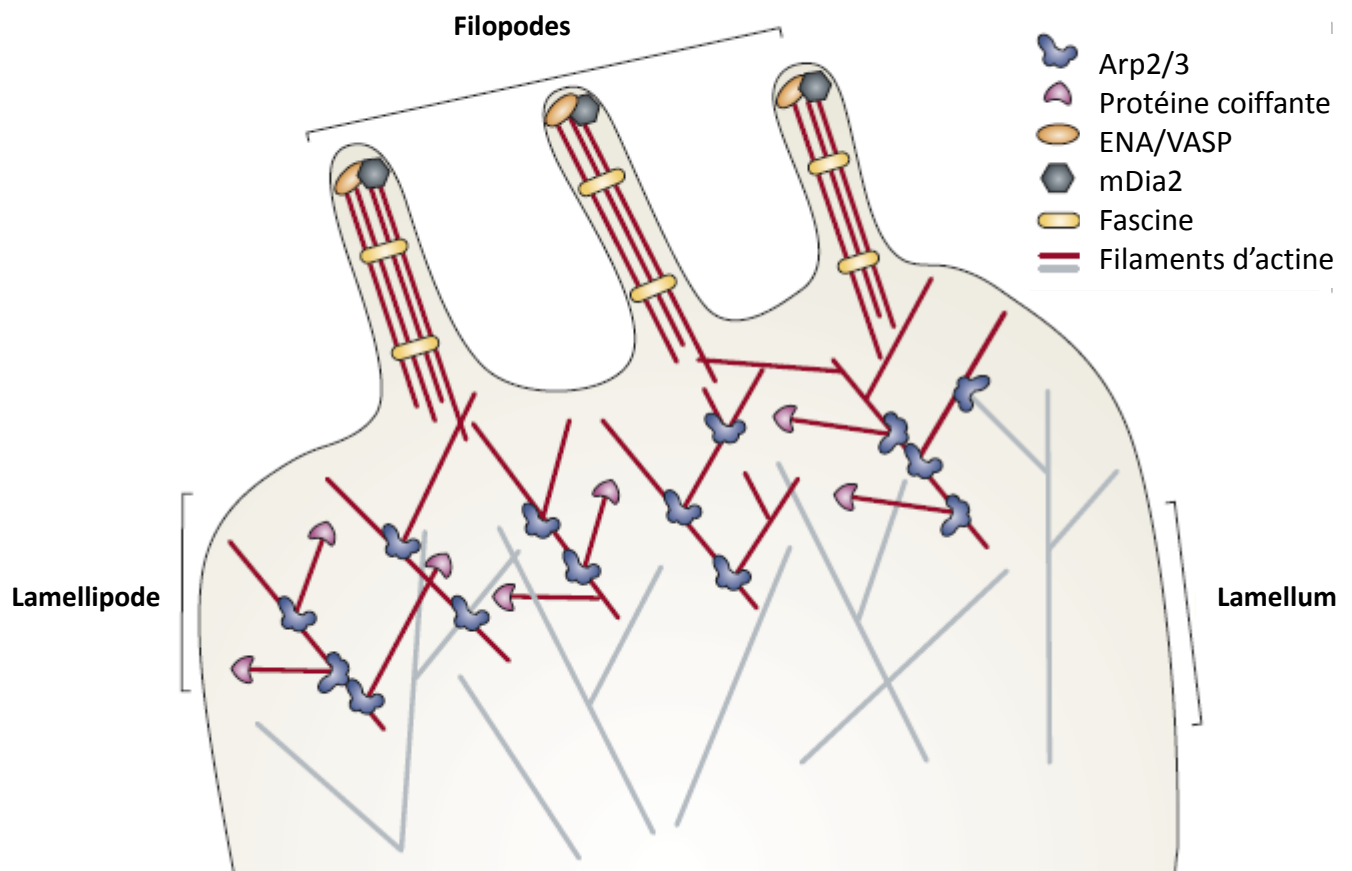


Figure 10. Modèle de formation des lamellipodes et des filopodes.

Au front d'une cellule en migration, la protéine Arp2/3 permet la formation du lamellipode en permettant la polymérisation de l'actine dont les filaments s'organisent à ce niveau en filaments branchés. Les protéines coiffantes se lient aux extrémités barbées des filaments d'actine pour mettre fin à leur élongation.

À l'arrière du lamellipode se situe le lamellum constitué de filaments d'actine plus longs et moins branchés. Des filopodes peuvent se former à partir du lamellipode. Ils sont également constitués de filaments d'actine organisés en faisceaux parallèles grâce à la fascine. D'après Heasman and Ridley, 2008.

2.3.3. Les invadopodes.

Les invadopodes sont des protrusions riches en actine filamenteuse localisées sur la surface ventrale des cellules migrant sur une matrice extracellulaire (Ridley et al., 2011). Les invadopodes, retrouvés dans les cellules tumorales invasives sont considérés comme étant la version transformée des podosomes, retrouvés dans des cellules invasives normales telles que les macrophages, les ostéoclastes ou les cellules dendritiques. Bien que quelques différences (longueurs, durée de vie) aient été observées entre les deux types de structures, les podosomes et les invadopodes sont globalement similaires d'un point de vue fonctionnel et structurel (Paz et al., 2014; Murphy et al., 2011).

Leur fonction cellulaire serait de coordonner la dégradation de la matrice et la migration. Ils ont été décrits pour la première fois il y a plus de 20 ans sur des fibroblastes transformés et ont depuis été observés sur de nombreuses lignées tumorales *in vitro* migrant en 2 et 3D. Leur observation *in vivo* et l'évaluation de leur importance physiologique est beaucoup plus récente (Lohmer et al., 2014). Ainsi, en 2012, Gligorijevic et al, observent que des cellules MTLn3 (lignée de carcinome mammaire de rat) injectées dans le fat-pad mammaire de rat forment des protrusions contenant des marqueurs d'invadopodes (cortactine et N-WASP). De plus, ils notent une corrélation positive entre la capacité de ces cellules tumorales mammaires à former des invadopodes et leurs capacités invasives *in vivo*, tout particulièrement durant l'intravasation (Gligorijevic et al., 2012). Cependant, la plupart des connaissances disponibles sur les invadopodes proviennent de l'étude en 2D de lignées de cellules cancéreuses.

Les mécanismes à la base de leur formation ne sont pas entièrement élucidés et nos connaissances à ce sujet s'appuient sur des études de cellules tumorales en culture, notamment de cancer du sein. L'initiation de la formation des invadopodes requerrait l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire via l'interaction d'intégrines. S'en suivrait l'activation et la libération de ces complexes de la protéine Src qui permettraient le recrutement à la membrane et l'activation des protéines d'échafaudage TKS4 et TKS5 (Tyr kinase substrate with five SH3 domains) et de la cortactine qui, à leur tour, recrutent plusieurs protéines régulant la polymérisation de l'actine aux invadopodes telles que le complexe Arp2/3 et N-WASP. La cortactine est également impliquée dans la maturation des

invadopodes qui comprend le recrutement et l'activation de multiples protéases dégradant la matrice, avec principalement la sécrétion de métalloprotéases de la matrice MMP2, MMP9 et la présentation à la pointe de l'invadopode de MT1-MMP (membrane type 1 MMP) (Paz et al., 2014 ; Murphy et al., 2011).

Ces différents types de protrusions nécessitent de nombreux réarrangements du cytosquelette, qui sont, pour la plupart, contrôlés par l'activité des petites RhoGTPases.

2.3.4. Les Rho GTPases

Les RhoGTPases représentent une famille de petites protéines (21-25kDa) hautement conservées dans le règne animal et végétal. Chez l'humain, il en existe 20 différentes (Ridley et al., 2015). Elles partagent une homologie de structure et lient le GTP qu'elles sont capables d'hydrolyser. Cette activité d'hydrolyse les implique dans les processus de réarrangement du cytosquelette et donc dans la migration cellulaire, mais aussi, dans la prolifération, la transformation et la différenciation cellulaire (Heasman et Ridley, 2008).

Ce sont des interrupteurs moléculaires qui sont actifs et capable de lier et activer leurs effecteurs lorsque liés au GTP et inactifs quand liés au GDP. Leur activité est finement régulée dans le temps et l'espace: les RhoGTPases sont activées à la membrane par les GEFs (guanine exchange factors) qui catalysent l'échange du GDP en GTP. L'action des GEFs est-elle même régulée par de nombreux récepteurs aux facteurs de croissance, des intégrines, des récepteurs aux cytokines et des cadhérines. Ainsi, les RhoGTPases sont des intégrateurs moléculaires de différents signaux extracellulaires. Une fois liées au GTP, elles sont capables d'interagir avec leurs nombreux effecteurs. La spécificité des fonctions des Rho GTPases est déterminée à la fois par l'expression tissu spécifique de leurs effecteurs et la régulation fine de la localisation des Rho GTPases au sein de la cellule. L'hydrolyse du GTP en GDP est permise par leur activité GTPase et l'association aux GAPs (GTPase-activating proteins). Les RhoGTPases sont ainsi inactivées et sont alors séquestrées dans le cytosol par les GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitors) empêchant la dissociation du GDP. De cette façon, les GTPases sont maintenues à distance des GEFs activateurs ou des effecteurs (Parri et al., 2010 ; **Figure 11**)

Les trois Rho GTPases les mieux caractérisées sont Rac (Rac1, Rac2, Rac3), Rho (RhoA, RhoB, RhoC) et Cdc42 (cell division control protein 42). Elles ont été impliquées dans la progression tumorale de nombreux cancers, jouant un rôle dans la prolifération, la survie et la migration des cellules tumorales (Li et al., 2014). Ainsi, Fritz et al. ont observé que dans les tumeurs mammaires de patientes les niveaux protéiques de RhoA, RhoB, Rac1, et Cdc42 sont augmentés comparés à ceux du tissu mammaire normal des même patientes. Il est intéressant de noter que les niveaux d'ARNm correspondants ne sont pas augmentés et qu'aucune mutation dans les gènes des Rho GTPases n'a été retrouvée (Parri et al., 2010 ; Fritz et al., 2002). Une augmentation de l'expression de RhoA mais non de Rac ou Cdc42 est associée à une augmentation du grade de la tumeur, suggérant une importance particulière de RhoA dans la progression tumorale mammaire (Fritz et al., 2002). Ce résultat pourrait être relié au rôle des GTPases dans la migration cellulaire qui leur est attribué depuis plus de 20 ans (Ridley et al., 2015).

Ainsi, une des fonctions principales des RhoGTPases réside dans leur capacité à réguler les éléments du cytosquelette et donc à contrôler la formation de protrusions essentielles au déplacement des cellules. Leurs rôles diffèrent suivant le type de protrusion et également le type cellulaire.

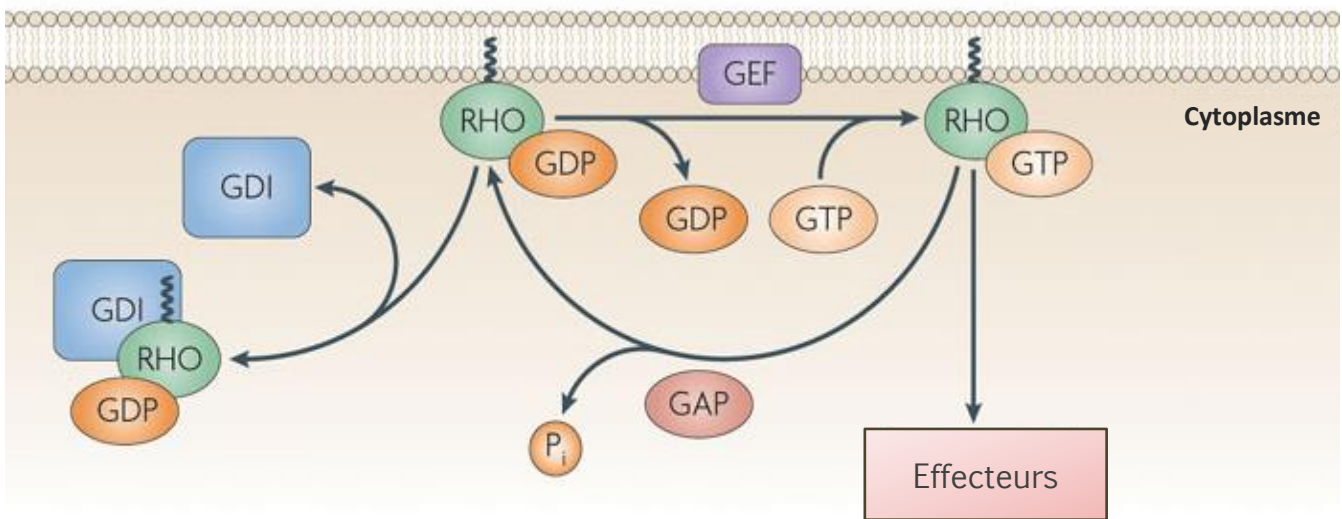


Figure 11. Cycle d'activation des Rho GTPases.

Les RhoGTPases sont actives lorsque liées au GTP et inactives lorsqu'elles lient le GDP. Elles sont activées à la membrane par les GEFs qui catalysent l'échange du GDP en GTP. Une fois liées au GDP, elles sont capables d'interagir avec leurs effecteurs. Les GAP facilitent l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP des GTPases. Les GEFs et les GAPs sont souvent retrouvés à la membrane plasmique. Dans le cytosol, les GDI séquestrent les RhoGTPases en les empêchant de se lier à la membrane.

D'après Tybulewicz et al., 2009

2.4. Les adhérences à la matrice extracellulaire

2.4.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau moléculaire dynamique et complexe entourant les cellules au sein des tissus. Elle est constituée de diverses molécules enchevêtrées tels que des protéines, des glycoprotéines, des protéoglycanes et des polysaccharides. De nombreuses enzymes de remodelage de la MEC contribuent également à sa structure. Ainsi, au microscope la MEC n'apparaît pas comme une structure uniforme et homogène mais plutôt comme un réseau de structures discontinues avec des zones très denses entrecoupées d'espaces libres (**Figure 12**). Au sein de ces structures, la MEC est capable de lier de nombreuses chimiokines et facteurs de croissance dont elle régule ainsi l'accessibilité et la disponibilité (Friedl et al., 2011). Ses propriétés physico-chimiques lui permettent de jouer à la fois un rôle de soutien tissulaire mais aussi d'influencer de nombreux aspects de la biologie des cellules qu'elle entoure. Réciproquement, la composition et l'organisation de la MEC sont régulées par ces cellules (Hynes et al., 2009).

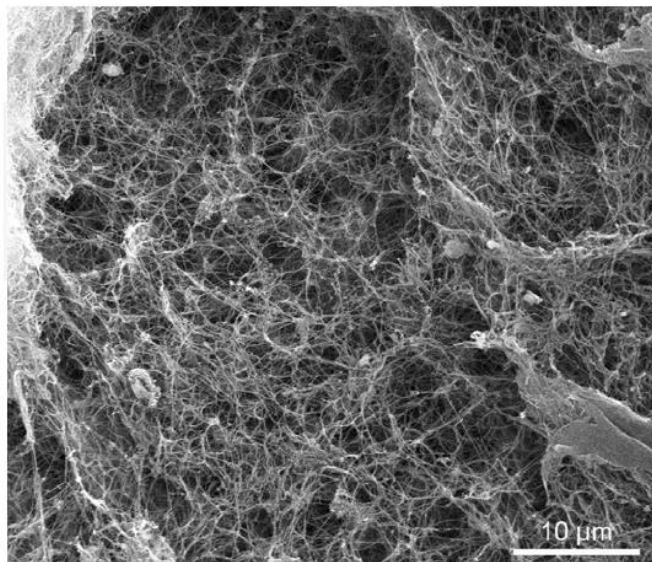


Figure 12. La matrice extracellulaire

Image de microscopie électronique (grossissement *5000) d'un hydrogel de fibrine et de collagène visant à mimer une matrice extracellulaire musculaire. L'hétérogénéité structurale est évidente. Image tirée de Klumpp et al., 2010.

Ainsi, les éléments composants les MEC sont variables suivant le type de MEC (Oskarsson et al., 2013). L'organisation et la nature de ses composants varie au sein d'un même tissu durant le développement embryonnaire ou même la progression tumorale (Oskarsson et al., 2013). Ainsi, dans le cancer du sein, des changements significatifs sont observés dans les lames basales ou les matrices interstitielles associées aux tumeurs primaires. Certaines de ces modifications sont associées à une augmentation des capacités invasives des cellules tumorales mammaires (Insua-Rodríguez et al., 2016). Aussi, l'augmentation des collagènes fibrillaires de type I et III dans les cancers du sein serait associée à l'invasion et l'agressivité des cellules tumorales (Kauppila et al., 1998). Au-delà de la composition, l'organisation de ces fibres aurait un rôle à jouer. Ainsi, dans le cancer du sein une modification de l'organisation des fibres de collagènes durant la progression tumorale entraînerait une augmentation de la rigidité de la matrice interstitielle (Insua-Rodríguez et al., 2016), rigidité qui a été associée à une augmentation des capacités invasives de cellules tumorales mammaires. Cet effet passerait, entre autre, par une activation de la signalisation en aval des intégrines (Levental et al., 2009). En outre, la rigidité de la matrice pourrait provoquer la formation d'invadopodes impliqués dans l'invasion (Alexander et al., 2008). Enfin, cette rigidité pourrait servir à la directionnalité de la migration des cellules tumorales qui auraient

tendance à migrer en direction de zones de matrice plus rigide (durotactisme, Lo et al., 2000).

La formation de rails de matrice sur lesquels s'accrochent les cellules tumorales peut également guider leur migration.

Ces changements dans la structure de la MEC sont notamment permis par des enzymes de modifications de la MEC telles que les MMP, les héparanases, les cathepsines ou les enzymes cross-linkantes.

Ainsi, la MEC joue un rôle essentiel à l'invasion des cellules tumorales, à la fois en jouant le rôle de barrière à franchir, mais aussi en régulant la disponibilité des facteurs de croissances ou des chimiokines, et même en favorisant par des réorganisations structurelles leur migration. Ainsi, les interactions cellule/matrice sont essentielles à la fois directement au mouvement des cellules qui doivent s'attacher et se détacher de la MEC (le substrat) pour progresser au sein de ce réseau, mais aussi car elles permettent aux cellules de sonder l'environnement dans lequel elles progressent.

Les cellules expriment une grande variété de récepteurs d'adhérences tels que les intégrines, les syndécans et autres protéoglycanes. Les intégrines sont les récepteurs les mieux étudiés et jouent un rôle majeur dans la migration cellulaire (Parsons et al., 2010.)

2.4.2. Les intégrines.

En 1986, Richard Hynes et ses collègues réalisèrent la première isolation et le séquençage de clone ADNc d'une intégrine de fibroblastes de poulet. Ce furent eux qui nommèrent ces récepteurs transmembranaires « intégrines », en tant que complexe intégrant, associant la matrice extracellulaire et le cytosquelette des cellules (Tamkun et al., 1986). Quasiment en parallèle, le laboratoire de Springer séquença la sous unité β d'une intégrine identifiée dans des leucocytes humains (Kishimoto et al., 1987 ; Hynes, 2004). Depuis, de nombreuses autres sous-unités d'intégrines ont été identifiées au sein de l'ensemble du règne animal multicellulaire (Johnson et al., 2009), de même que les protéines résidant avec les intégrines dans ces adhérences à la matrice.

Ainsi, chez les mammifères, il a été identifié 18 sous-unités α et 8 sous-unités β d'intégrines. Elles forment des récepteurs hétérodimériques transmembranaires comprenant un grand domaine extracellulaire capable de lier la matrice extracellulaire, un domaine transmembranaire unique et un court domaine cytoplasmique dénué d'activité catalytique mais capable de faire le lien avec le cytosquelette. Les domaines extracellulaires et les différentes associations entre ces sous-unités (au moins 24) déterminent la spécificité de liaison aux différents ligands de la matrice extracellulaire. Ainsi, les hétérodimères $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ lient la fibronectine, les $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ le collagène et les $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ lient la laminine (Huttenlocher et al., 2011). Leur liaison d'un côté à la matrice et de l'autre au cytosquelette des cellules permet une transmission bidirectionnelle de force à travers la membrane plasmique. Au-delà de leur rôle d'ancrage mécanique, les intégrines transmettent également des signaux chimiques en intracellulaire (signalisation outside-in). Par ces deux mécanismes, les intégrines fournissent à la cellule des informations sur leur état d'adhérence et les propriétés physico-chimiques de leur environnement immédiat induisant un panel de réponses cellulaires (Harburger and Calderwood, 2009). Aussi, elles sont essentielles au développement embryonnaire, au maintien des architectures tissulaires, aux phénomènes de réparation de blessures ainsi qu'aux défenses immunitaires (Pan et al., 2016). En physiopathologie, elles sont impliquées dans la progression tumorale de nombreux cancers, jouant un rôle non seulement dans la migration mais aussi dans la prolifération et la survie. Cette implication dans l'oncogenèse serait dans les cellules tumorales à la fois dépendante et indépendante de leur capacité à lier la matrice (Desgrosellier et al., 2009 ; Seguin et al., 2014.).

L'expression des intégrines peut être modifiée dans les cellules tumorales. Ainsi, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_6$ qui sont généralement faiblement exprimées dans les épithéliums normaux, peuvent être fortement exprimées dans certaines tumeurs (Desgrosellier et al., 2010). De plus, des études cliniques ont établi une corrélation entre l'expression spécifique de certaines intégrines et les issues cliniques. Par exemple, dans le cancer du sein, l'expression des intégrines $\alpha_6\beta_4$ est associée à une augmentation du grade de la tumeur et une diminution de la survie (Friedrichs et al., 1995 ; Diaz et al., 2005).

2.4.3. Les complexes d'adhérences

L'adhérence entre le cytosquelette des cellules et la matrice extracellulaire permet la transmission de force au travers la membrane plasmique. Jusqu'à présent aucune connexion directe entre les intégrines et le cytosquelette d'actine n'a été identifiée. Ces liens sont médiés de façon indirecte par des complexes d'adhérences protéiques (**Figure 13**).

Les mécanismes et la cinétique exacte du recrutement de ces complexes ne sont pas clairement établis, et ceux-ci varient considérablement selon le type cellulaire mais également selon le type d'adhérences (Lawson et Schlaepfer, 2012). Il est supposé que l'interaction des intégrines avec la MEC, induit un changement conformationnel séparant les sous-unités α et β , exposant au niveau de leurs domaines intracellulaires des sites de liaisons à des protéines cytoplasmiques (Wolfenson et al., 2013).

De même, la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire peut induire un rassemblement des intégrines (clustering). Ainsi, les hétéromères forment des oligodimères (Shattil et al., 2011). L'affinité pour leur ligand extracellulaire ainsi que le rassemblement planaire des intégrines peuvent aussi être régulés depuis l'intérieur de la cellule par des changements conformationnels de leurs domaines extracellulaires en réponse à des signaux intracellulaires induits par d'autres types de récepteurs (inside-out signalling ; Harburger and Calderwood, 2009). Ces signaux intracellulaires peuvent notamment induire la liaison de certaines protéines aux domaines intracellulaires des intégrines telle que la taline (Shattil et al., 2010).

La composition des complexes d'adhérences varie considérablement selon le type cellulaire, l'environnement et même dans le temps au sein d'une même cellule. Ainsi, le groupe de Humphries, en intégrant plusieurs études protéomiques réalisées sur des complexes d'adhérences ayant été isolés depuis différentes lignées cellulaires humaines et souris montrent que l'adhésome des intégrines implique plus de 2000 protéines différentes. Ils mettent ainsi en évidence la grande complexité et variabilité de ces complexes d'adhérences.

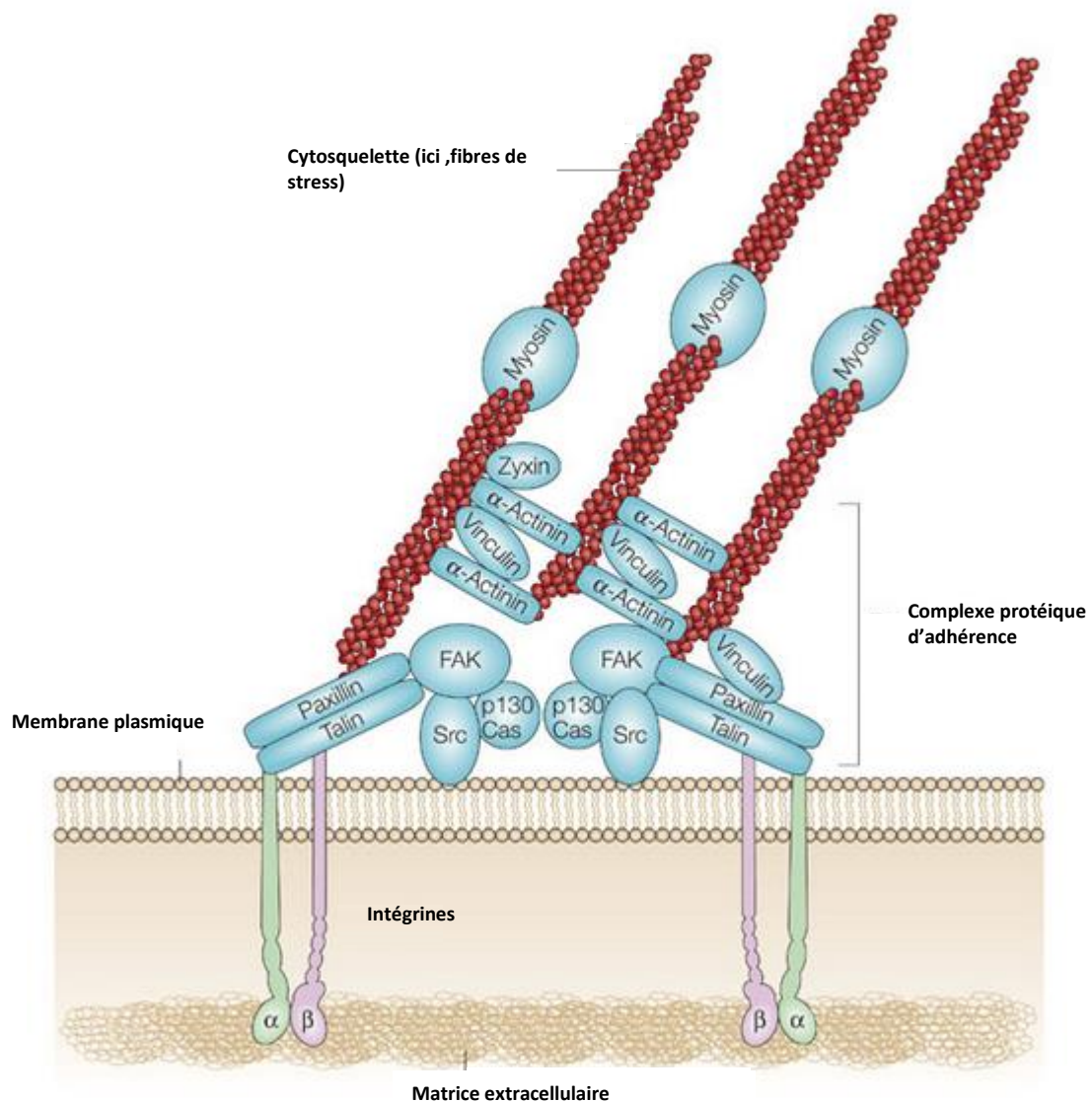


Figure 13. Schéma d'une adhérence focale.

Les adhérences focales relient la matrice extracellulaire au cytosquelette des cellules. Ce lien est médié par les intégrines qui forment des hétérodimères de sous unités α et β , interagissant via leur domaines extracellulaires avec des composants de la matrice et via leurs courts domaines intracellulaires à des protéines du complexes d'adhérences constituant un pont entre les intégrines et le cytosquelette d'actomyosine. D'après Mitra et al., 2006

Cependant, certaines protéines sont retrouvées de façon plus systématique (> 5 sets de données) et les auteurs définissent ainsi un adhésome consensus de 60 protéines (Horton et al., 2015).

Au sein de ces complexes, sont retrouvées des protéines se liant à l'actine telles que la taline, la vinculine, l'alpha actinine ainsi que des protéines impliquées dans la signalisation des intégrines telles que la kinase des adhérences focales (FAK) et la paxilline, toutes deux capables de réguler l'activité des Rho-GTPases se retrouvant ainsi au carrefour de l'assemblage des adhérences et de l'organisation du cytosquelette. Ainsi, la formation des adhérences à la matrice influence la dynamique du cytosquelette qui lui-même est capable de moduler la dynamique d'assemblage et de désassemblage des adhérences (Parsons et al., 2010).

Ces régulations bidirectionnelles coordonnent la transmission et la régulation spatio-temporelle des forces entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette ainsi que la signalisation émanant de ces complexes, essentielle à la migration directionnelle (Parsons et al., 2010).

Aussi, une cellule en migration présente différents types d'adhérence régulés dans le temps et l'espace.

2.4.4. Dynamique des adhérences de cellules en migration.

L'adhérence de cellules en migration a été étudiée principalement sur des cellules en culture migrant individuellement sur une matrice-extracellulaire en 2D. Bien que ces adhérences aient été principalement étudiées en 2D, elles ont également été observées en 3D (Harunaga et al., 2011 ; Kubow et al., 2011). Cependant, la plupart des connaissances dont nous disposons quant à leur assemblage/désassemblage, ou les voies de signalisation émanant de ces complexes sont issues d'études de cellules en culture, statiques ou migrantes, en 2D.

Aussi, il a été constaté qu'une cellule en migration présente différents types d'adhérences régulés dans le temps et l'espace (**Figure 14**).

2.4.4.1. Les adhérences naissantes.

Sur une cellule en migration en 2D, les adhérences au substrat se forment initialement au sein du lamellipode au front de migration. Ce sont les adhérences naissantes. Ces premières interactions avec la matrice forment des complexes en forme de points de petites tailles ($<0.25\mu\text{m}^2$ selon Thievessen et al., 2013), très dynamiques, de durée de vie relativement courte (Vicente-Manzanares et al., 2011). Les mécanismes à la base de leur formation sont mal compris et ceux-ci dépendent fortement du type cellulaire.

Deux modèles ont été proposés. Le premier postule que la nucléation des adhérences naissantes est initiée par la liaison des intégrines aux protéines de la MEC, provoquant leur clustering et l'assemblage de complexes d'adhérences au niveau de leurs domaines cytoplasmiques. Il a été proposé que des petits complexes naissants peuvent ensuite fusionner en de plus gros complexes. Selon le deuxième modèle, l'assemblage des adhérences naissantes serait permis par la polymérisation de l'actine autour de laquelle s'initierait la formation des complexes protéiques des adhérences avant que les intégrines ne lient la MEC (Parsons et al., 2010). Les deux modèles ne sont probablement pas exclusifs. L'ordre dans lequel les constituants de ces adhérences sont recrutés n'est pas clair. Il est supposé que FAK ou la Taline seraient les premières recrutées mais cet ordre de recrutement pourrait dépendre du type cellulaire et des sous-unités d'intégrines composant l'adhérence (Lawson and Schlaepfer, 2012). Leur formation est dépendante de la polymérisation de l'actine et indépendante de l'activité de la myosine II (Choi et al., 2008). Les mécanismes liant la polymérisation de l'actine et la formation des adhérences naissantes sont mal connus (Parsons et al., 2010).

Les adhérences naissantes contiennent des protéines classiquement retrouvées aux adhérences telles que la taline, la vinculine, FAK, Src et la paxilline et présentent un fort niveau de phosphorylations sur tyrosine, sérines et thréonines, notamment de FAK, Src et de la paxilline. Ces phosphorylations peuvent constituer des sites de liaison pour d'autres protéines et permettre le recrutement de protéines signalisantes (GEF et GAP des RhoGTPases par exemple) (Vicente-Manzanares et al., 2011).

Au fur et à mesure que la cellule en migration progresse, les adhérences naissantes initialement localisées au front de migration se retrouvent à l'arrière du lamellipode. Il est

supposé que l'actine organisée en réseau branché dans le lamellipode constitue un support aux adhérences naissantes. Ainsi, lorsqu'elles se retrouvent à l'arrière du lamellipode, dans une zone de dépolymérisation de l'actine qui les en découple, la majorité des adhérences naissantes se désassemble. Ce désassemblage serait également médié par des signaux biochimiques médiés par des kinases, des phosphatases ou des protéases qui agiraient sur les protéines du complexe d'adhérence. Une proportion d'entre elles peut aussi s'élargir et s'allonger pour former des complexes focaux, suivant un phénomène de maturation. La maturation coïncide avec de courts arrêts dans la progression du front de migration qui dépendent de la contractilité permise par la myosine II (Parsons et al., 2010).

2.4.4.2. Les complexes focaux.

Les complexes focaux diffèrent des adhérences naissantes de par leur localisation (entre le lamellipode et le lamellum juste à l'arrière) et leur taille. Leur formation peut être induite par une Rac constitutivement active (Nobes et al., 1995) et leur présence dépend de la myosine II (Choi et al. 2008). Cependant, leur composition moléculaire est similaire à celle des adhérences naissantes. Les complexes focaux sont des structures transitoires: ils se transforment rapidement en adhérences focales (Vicente-Manzanares et al., 2011).

2.4.4.3. Les adhérences focales.

Les adhérences focales sont définies par leur taille (2µm de largeur, 3-10µm de longueur) et leur localisation à l'extrémité de larges faisceaux d'actine ou d'actomyosine. Ces adhérences présentent un niveau moindre de phosphorylation de FAK, Src et paxilline (Vicente-Manzanares et al., 2011). À mesure que les forces de tractions permettent à la cellule d'avancer, les adhérences focales se désassemblent. Tout comme le désassemblage des adhérences naissantes, celui des adhérences focales ne dépendrait pas uniquement des forces contractiles mais aussi et de façon complémentaire, de signaux biochimiques régulés par des protéases, des kinases et des phosphatases (Webb et al., 2004).

Bien que des différences soient observées entre ces trois types d'adhérences, notamment concernant les niveaux de phosphorylations des protéines du complexe, il existe entre elles un certain continuum. De plus, leur formation dépendrait du type cellulaire. Ainsi, des cellules migrant rapidement telles que des macrophages ou des neutrophiles présentent de petites adhérences très dynamiques (de type adhérences naissantes) alors que des cellules plus contractiles, telles que les fibroblastes présentent des adhérences plus stables (adhérences focales et complexes focaux ; Parsons et al., 2010). De plus, les types d'adhérences peuvent être influencés par la rigidité de la matrice. Ainsi, des fibroblastes ou des cellules épithéliales migrant sur une matrice peu rigide présentent des adhérences petites et dynamiques. A l'inverse, une matrice plus rigide est associée à la formation d'adhérences plus larges et plus stables (Vicente-Manzanares et al., 2011).

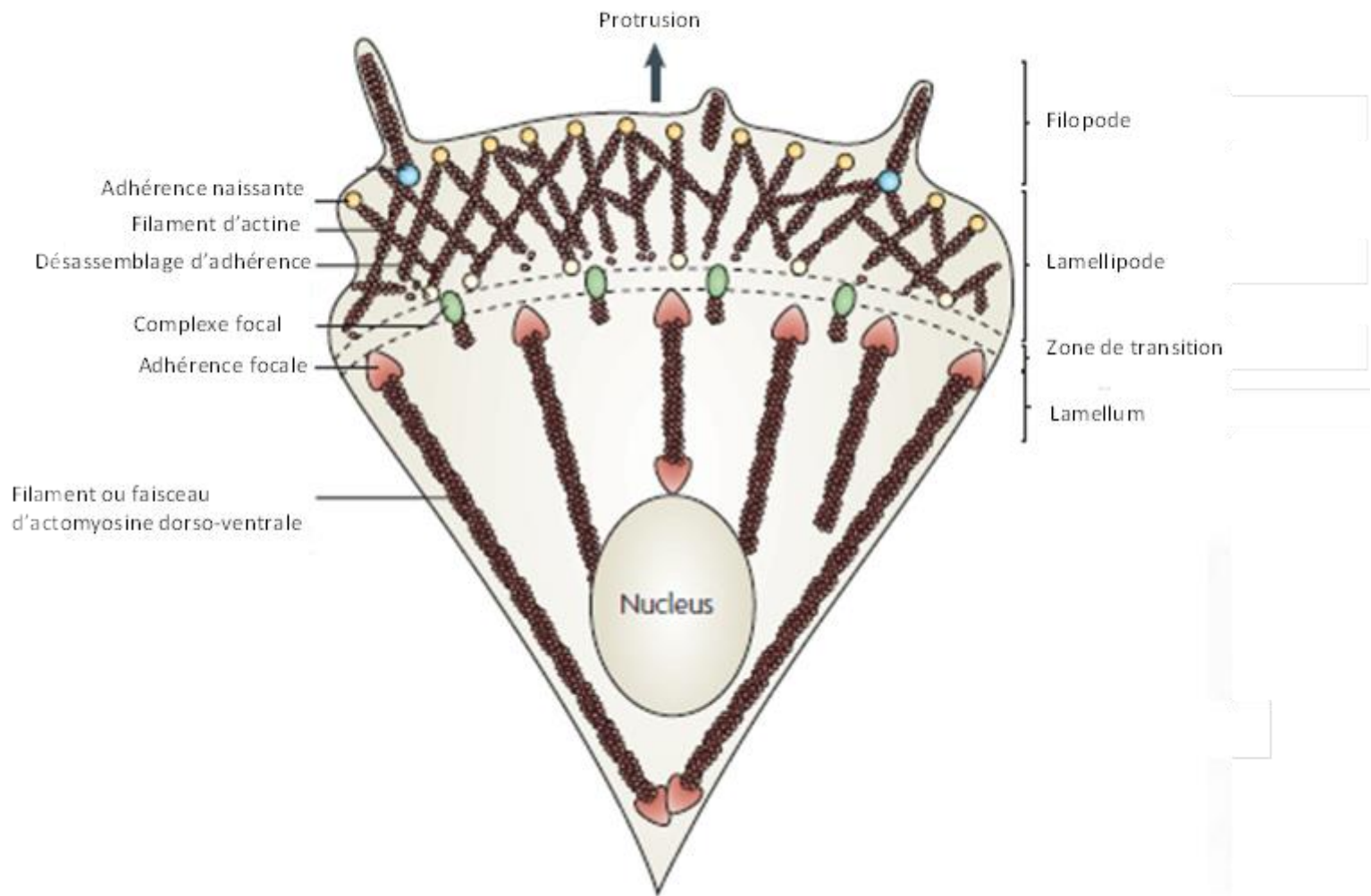


Figure 14. Dynamique des adhérences d'une cellule en migration.

Les adhérences se forment (adhérence naissantes) au sein du lamellipode. Dans la zone de transition entre le lamellipode et le lamellum les adhérences naissantes se désassemblent ou s'allongent en adhérence plus matures (complexes focaux ou adhérences focales). Le processus de maturation est accompagné par un changement d'organisation de l'actine en filament et faisceaux, et la contractilité de l'actomyosine permet la stabilisation et l'allongement des adhérences. D'après Parsons et al., 2010.

2.5. Conclusions du chapitre II.

L'invasion cellulaire apparait comme un processus impliquant la coordination de nombreux évènements dont la formation de protrusions et des cycles d'assemblage/désassemblage rapides d'adhérences à la matrice. Ces dynamiques sont induites en réponse à des stimuli extérieurs transmis à l'intérieur de la cellule via l'interaction des intégrines avec la matrice ou la fixation de facteurs de croissance à leurs récepteurs. Le traitement de ces entrées nécessite des protéines intégratrices stimulées par, et ainsi capables de traduire ces différents signaux en réponses cellulaires adaptées. FAK constitue une de ces protéines intégratrices, régulant de façon centrale la formation de protrusions, l'adhérence à la matrice et donc la migration cellulaire (Mitra et al., 2005).

Chapitre III : La kinase des adhérences focales (FAK).

3.1. Généralités

En 1992, Schaller et al., isolèrent l'ADN complémentaire codant pour une protéine précédemment identifiée comme étant fortement tyrosine-phosphorylée en réponse à la transformation par l'oncogène v-Src de fibroblastes embryonnaires de poulet (Kanner et al., 1990). Ils montrèrent que cette protéine possède une activité tyrosine kinase et qu'elle se localise aux adhérences focales. Ainsi, ils la nommèrent la kinase des adhérences focale (FAK) (Schaller et al., 1992 ; **Figure 15**).

Par la suite, ayant été identifiée chez l'humain dans des cellules de sarcome et son expression étant plus élevée dans des sarcomes de haut grades, son importance dans la progression tumorale fut supposée (Weiner et al., 1993 ; Weiner et al., 1994). Cette hypothèse a été l'origine de nombreuses études précisant le rôle de FAK dans la progression tumorale. De plus, l'importance de sa fonction en dehors des processus tumoraux a été pressentie avec la découverte de FAK dans de nombreux autres organismes reflétant sa grande conservation au cours de l'évolution (Corsi et al., 2006).

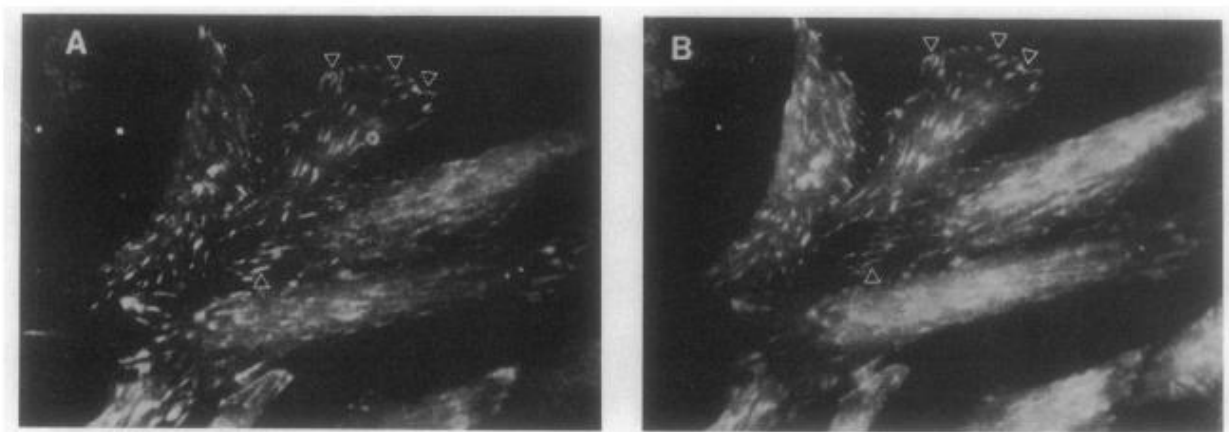


Figure 15. Première image publiée d'immunofluorescence de FAK.

Shaller et al. montrèrent en 1992 que FAK est localisée aux adhérences focales de cellules embryonnaire de poulet en utilisant l'anticorps ayant permis d'isoler la protéine. (panneau **A**) Ils s'assurèrent que ce marquage correspondait bien à celui d'adhérence focales en le comparant à celui d'un anticorps dirigé contre la tensine, une protéine reconnue comme composant de ces structures (panneau **B**). Tiré de Schaller et al., 1992.

Depuis ces premières découvertes, un grand nombre d'études menées à la fois dans des lignées tumorales et *in vivo*, principalement chez la souris, ont permis d'attribuer diverses fonctions à cette protéine. Ainsi, en physiologie, elle est essentielle à plusieurs processus du développement embryonnaire. En pathologie, elle a été impliquée dans la progression tumorale de différents cancers. Concernant les mécanismes par lesquels elles régulent ces processus, il est admis qu'elle est impliquée, en aval des intégrines et des récepteurs aux facteurs de croissance, dans la survie, la prolifération et la migration de nombreux types cellulaires (Hall et al., 2011 ; Yoon et al., 2015).

Afin de comprendre ses fonctions, il est important de bien connaître la structure de FAK.

3.2. Structure et régulation de FAK

Chez l'Homme, le gène de FAK est porté par le chromosome 8 et code pour une tyrosine-kinase de 125kDa. Elle est exprimée dans la plupart des tissus adultes. Sa structure lui permet de jouer à la fois le rôle de protéine kinase et de protéine d'échafaudage (Hall et al., 2011).

3.2.1. Structure de FAK

FAK est constituée de trois domaines alignés à la suite les uns des autres. En N-terminal, se trouve un domaine FERM (Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin). Celui-ci est suivi d'une région liaison (linker région) d'environ 40 résidus puis du domaine kinase en position centrale. Le domaine kinase est séparé du domaine FAT (focal adhesion targeting domain) en C terminal par des régions riches en proline. Ces régions peuvent servir de site de liaison pour des protéines à domaine SH3 (SRC Homology 3 Domain) telle que la protéine p130 Cas, une protéine adaptatrice retrouvée aux adhérences, ou GRAF (GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase), une GAP de la petite GTPase Rho (Hall et al., 2011; Zhao and Guan, 2011 ; Lietha et al., 2007 ; **Figure 16**).

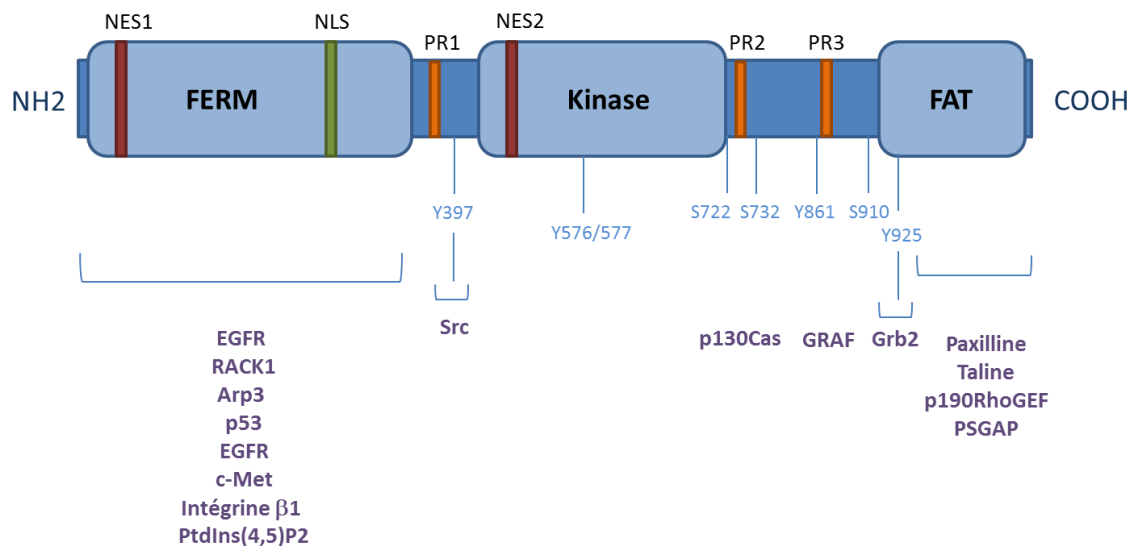


Figure 16. Structure, sites de phosphorylations (en bleu) et interactions de FAK (en violet).

3.2.1.1. Le domaine FERM

Les domaines FERMs sont des domaines protéiques constitués d'environ 300 acides aminés et retrouvés dans de nombreuses protéines (une trentaine de protéines chez les mammifères). Ils sont typiquement connus pour permettre à ces protéines de se lier au cytosquelette, à des protéines transmembranaires et à des phospholipides. Ainsi chez l'humain, ce domaine est fréquemment retrouvé dans des protéines servant de lien entre le cytosquelette et la membrane plasmique des cellules (Hall et al., 2011). Ils ne sont pas retrouvés dans des kinases, à deux exceptions près: les Janus kinases (JAK) et FAK (Frame et al., 2010).

L'identification du domaine FERM dans le domaine N terminal de la protéine FAK a été permise par des techniques d'alignements. Le domaine FERM de FAK s'étend des résidus 35 à 362 et ne partage qu'entre 12 et 15% d'homologie avec les séquences d'autres domaines FERM (Schultz et al., 1998). La cristallographie du domaine FERM de FAK couplé à l'utilisation de mutants tronqués ou de délétion ont éclairé la fonction de ce domaine dans FAK. Ainsi, le

domaine FERM de FAK joue trois rôles différents dans la régulation de la fonction de FAK: (1) il est essentiel à la régulation de l'activation de FAK (*cf. sous partie activation de FAK*) ; (2) il médie l'interaction de FAK avec de nombreuses protéines ou lipides; enfin (3), il régule la localisation subcellulaire de FAK (Lee et al., 2015).

Le domaine FERM de FAK contient comme tous les domaines FERMs trois lobes F1, F2 et F3 (Ceccarelli et al., 2006). Le F1, qui s'étend des résidus 33 à 127, contient des séquences de localisation (NLS) et d'export nucléaire (NES) qui pourraient contribuer à la localisation nucléaire de FAK (Frame et al. 2010 ; **Figure 16**). Le lobe F2, des résidus 128 à 253 contient un regroupement de résidus basiques (KAKTLRK) nécessaires à l'interaction de FAK avec certains de ces ligands et ainsi à son activation (Chen and Chen 2006). Les lobes F1 et F2 sont capables de se lier respectivement à la tyrosine 397 et au domaine kinase de FAK (Frame et al., 2010). Ces interactions sont majeures dans la régulation de l'activation de FAK (*cf partie activation de FAK, Figure 17*). Le lobe F3 s'étend des acides aminés 254 à 352 et ressemble à un domaine PH (pleckstrin homology) qui sont des domaines capables de se lier aux phospholipides (Hall et al., 2011).

3.2.1.2. Le domaine kinase

Le domaine kinase de FAK s'étend des résidus 411 à 686 (**Figure 16**). Sa cristallographie a révélé que celui-ci contient deux lobes, un petit lobe N-terminal et un plus grand lobe du côté C-terminal. Le cœur catalytique et le site de liaison à l'ATP sont situés dans le sillon formé par ces deux lobes. Dans le domaine catalytique de FAK, se trouve une seconde séquence d'exportation nucléaire (Lee et al., 2015). Au sein du domaine kinase, se situe également la boucle d'activation de la kinase (résidus 564–592) dont la phosphorylation sur les tyrosines 576 et 577 permet de fortement augmenter l'activité catalytique de FAK (Lietha et al., 2007).

3.2.1.3. Le domaine FAT

Le domaine FAT de FAK s'étend des résidus 917 à 1053 (**Figure 16**). Comme son nom « focal adhesion targetting domain » l'indique, il a été impliqué dans la localisation de FAK aux

adhérences (Hildebrand et al., 1993). Sa cristallographie a révélé qu'il est constitué de 4 hélices alpha regroupées de façon antiparallèle. À l'interface des hélices 1 et 4 et des hélices 2 et 3, sont situés deux « patches » hydrophobes. Ces « patches » hydrophobes sont impliqués dans l'interaction de FAK avec l'un de ses effecteurs majeurs, la paxilline (Hayashi et al., 2002 ; Hall et al., 2011)). La tyrosine 925 située au sein de l'hélice 1 du domaine FAT est un site important de phosphorylation de FAK qui permet la liaison de la protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), une protéine adaptatrice impliquée dans diverses voies de signalisation (Mitra et al., 2005). Le domaine FAT interagit aussi avec divers GEFs et GAPs régulateurs des Rho GTPases tels que p190RhoGEF et PSGAP (Lee et al., 2015). Enfin, la taline, une protéine majeure de l'adhérence faisant le lien entre les intégrines et le cytosquelette, est également capable d'interagir avec FAK via ce domaine FAT (Hall et al., 2011).

Il faut noter qu'une protéine à la séquence et structure fortement similaire à FAK, la proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2), a été découverte entre autre chez l'humain. Ainsi PYK2 est également constituée d'un domaine kinase, d'un domaine FAT et d'un domaine FERM. Cependant, les régulations et fonctions de FAK et PYK2 semblent assez différentes. Par exemple, PYK2 n'est pas localisée aux adhérences à la matrice (Sulzmaier et al., 2014).

3.2.2. Modifications post-traductionnelles.

3.2.2.1. Phosphorylations sur tyrosines.

Plusieurs sites de phosphorylation sur tyrosine ont été identifiés au sein de la protéine FAK humaine : Y397, Y407, Y576/577, Y861 et Y925 (Calalb et al., 1995, **Figure 16**). Les fonctions de certaines de ces phosphorylations ont été étudiées.

La phosphorylation sur tyrosine 397 située entre le domaine FERM et le domaine kinase est le résultat d'une autophosphorylation, en cis ou en trans. Elle est impliquée dans l'activation de FAK et permet la création d'un site de liaison pour de nombreuses protéines dont la protéine Src mais aussi la PI3K, la phospholipase C gamma (PLC- γ) et Grb-7 (Golubovskaya and Cance, 2007).

Les phosphorylations Y576 et Y577 au sein de la boucle activatrice du domaine kinase de FAK régulent l'activité catalytique de FAK. Elles sont nécessaires à l'établissement d'une activité catalytique totale de FAK (Calalb et al., 1995).

Ces phosphorylations ont été impliquées dans la régulation de différents processus cellulaires (*cf partie 3.3. Fonction de FAK*).

3.2.2.2. Phosphorylations sur sérines et thréonines.

Plusieurs sites de phosphorylations sur des sérines ont également été identifiés sur la FAK humaine : S722, S732, S843 et S910 (**Figure 16**). Il a été montré dans des cellules endothéliales que la phosphorylation 732 est induite par la serine thréonine kinase ROCK en réponse au VEGF. Cette phosphorylation permettrait ensuite le recrutement de PYK2 sur FAK induisant la phosphorylation sur tyrosine 407 (Le Bœuf et al., 2006). Dans des neurones de cerveaux de souris, cette phosphorylation S732 par la serine – thréonine kinase Cdk5 (cyclin dependant like kinase 5) est impliquée dans la migration de ces neurones (Xie et al., 2003). Dans des fibroblastes murins, il a été montré que la phosphorylation S843 est induite en réponse à l'activation de récepteur couplé à la protéine G (Jacamo et al., 2007).

En 2005, une analyse par spectrométrie de masse d'une FAK murine a permis l'identification de nouveaux sites de phosphorylations dont une grande partie sur sérines ou thréonines conservées chez l'Homme : S29, S390, S392, T394, T406, T700, S708, S725, S726, S766, S894, Y899, et S911 (Grigera et al., 2005). Les mécanismes à l'origine de ces nouvelles phosphorylations n'ont pas encore été étudiés.

Dans l'ensemble, les rôles des phosphorylations sur sérine ou thréonine de FAK ont été beaucoup moins étudiés que ceux des phosphorylations sur tyrosines. Cependant, la proximité des sérines phosphorylées avec des sites d'interaction avec d'autres protéines permet à Parsons et collègues de suggérer qu'elles pourraient moduler la liaison et la stabilité de l'interaction de FAK avec des protéines de signalisation en aval (Parsons et al., 2003).

3.2.2.3. Sumoylation.

Il a été montré que FAK pouvait être sumoylée par la protéine SUMO sur sa lysine 152. Cette sumoylation induit la localisation nucléaire de FAK et augmente son activité d'autophosphorylation (Golubovskaya et al., 2007).

3.2.3. Activation de FAK

3.2.3.1. Levée de l'auto-inhibition

L'activation de FAK requière la levée de l'autoinhibition médiée par l'interaction de son domaine FERM avec son domaine kinase. Le domaine FERM a d'abord été impliqué dans l'inhibition d'activation de FAK par des études montrant que des mutants FAK de délétion de ce domaine présentent une augmentation de leur activité catalytique (Jacamo and Rozengurt, 2005) et, qu'inversement, le domaine N-terminal de FAK inhibe l'activité de FAK *in vitro* (Cooper et al., 2003). La cristallographie d'un fragment de FAK contenant à la fois le domaine FERM et le domaine kinase a permis de constater que ces deux domaines interagissent. Cette interaction a lieu en deux endroits : via le domaine F2 du FERM et le lobe C-terminal du domaine kinase et entre le sous domaine F1 et le lobe N-terminal du domaine kinase (Lietha et al., 2007). Des mutations ponctuelles au sein du domaine F2 FERM (Y180A/M183A) ou au sein du domaine kinase (F596D) lèvent l'interaction inhibitrice FERM/kinase (Lietha et al., 2007). Ces liaisons du domaine FERM au domaine kinase masquent le site catalytique de FAK et empêchent l'autophosphorylation de la tyrosine 397 et les phosphorylations sur tyrosine 576 et 577 par Src.

La première étape d'activation de FAK implique ainsi la séparation du domaine FERM du domaine kinase de FAK, séparation qui serait permise par la liaison d'un phospholipide ou d'une protéine au domaine FERM (**étape 1, figure 17**). Ainsi, parmi les facteurs capables de se lier au domaine FERM de FAK, on retrouve la protéine RACK1 (Receptor for activated kinase C 1), Arp3 (Actin-related protein 3), p53, l'EGFR, c-Met, l'euzrin, l'intégrine $\beta 1$ et le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) (Frame et al., 2010). La liaison de ces

facteurs aurait lieu au niveau du lobe F2 contenant un petit domaine basique (KAKTLRK) (Hall et al., 2011).

La séparation du domaine FERM du domaine kinase autorise l'autophosphorylation rapide de FAK sur la tyrosine 397 (**étape 2, figure 17**). L'activation catalytique complète de FAK est permise par la liaison de Src sur la tyrosine 397 et les phosphorylations par Src des tyrosines 576 et 577 dans la boucle d'activation du domaine kinase (**étape 3, figure 17**). La FAK ainsi activée adopte une conformation qui ne peut plus être inhibée par la liaison du domaine FERM, la boucle d'activation phosphorylée empêchant cette liaison FERM/kinase (**étape 4, figure 17**). Le retour dans un état autoinhibé requière donc l'activité de phosphatases (**étape 5, figure 17** ; Hall et al., 2011 ; Frame et al., 2010 ; Lee et al., 2015).

L'interaction FAK/Src permet également l'activation de Src, par un mécanisme similaire de levée d'auto-inhibition. Le complexe des protéines FAK/Src ainsi mutuellement activées est alors capable de phosphoryler différents effecteurs et enclenche plusieurs voies de signalisation aboutissant à différentes réponses cellulaires (Zhao et al., 2011). Les deux substrats principaux par ce complexe sont p130Cas et la paxilline (Mitra et al., 2006).

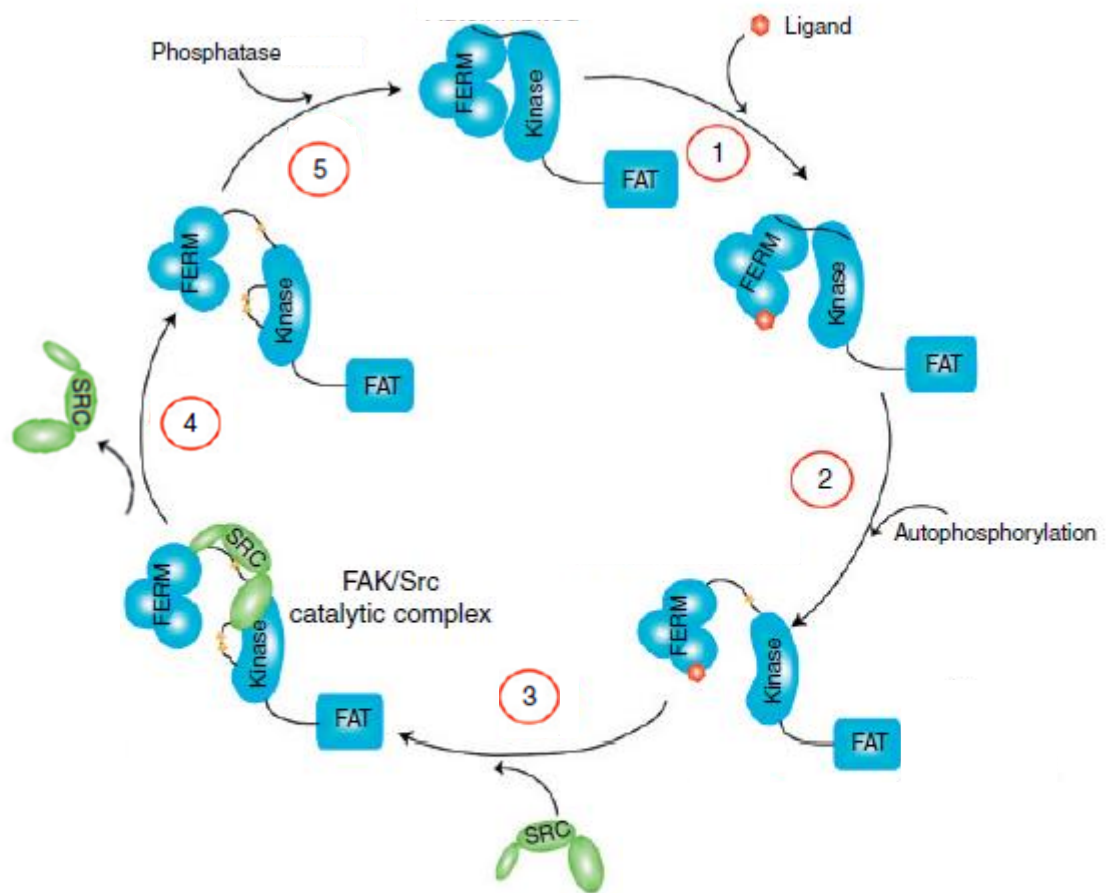


Figure 17. Modèle d'activation/inactivation de FAK.

Dans son état inactif, FAK est en conformation fermée, son domaine FERM se lie à son domaine kinase. Lorsqu'un ligand se lie au domaine FERM, celui-ci se sépare du domaine kinase (1). FAK est alors capable de s'autophosphoryler sur sa tyrosine 397 (2). Cette phosphorylation crée un site de liaison SH2 auquel Src peut se lier (3). Src phosphoryle alors FAK sur les tyrosines 576/577 dans la boucle d'activation du domaine kinase. Ces phosphorylations maintiennent FAK dans un état d'activité kinase maximal même après le détachement de Src (4). L'action de phosphatases est ainsi nécessaire à un retour de FAK dans un état inactif autoinhibé (5). D'après Hall et al., 2011

3.2.3.2. Signaux induisant l'ouverture de FAK

L'activation de FAK signée par la phosphorylation sur Y397 a été observée dans de nombreux types cellulaires en aval de la liaison de la plupart des intégrines à la matrice extracellulaire et a été associée à l'assemblage de nouvelles adhérences (Giancotti et Ruoslahti, 1999).

FAK est également activée en aval de la liaison de facteurs de croissance comme l'EGF, le HGF, le PDGF ou le VEGF à leurs récepteurs (Mitra et al., 2006). Ainsi, FAK est capable d'intégrer des signaux en provenance des intégrines et des facteurs de croissance (Sieg et al., 2000).

Cependant, les mécanismes reliant les intégrines ou les récepteurs aux facteurs de croissance à l'activation de FAK sont très mal compris.

L'utilisation de sondes FRET (fluorescence resonance energy transfer) de FAK reflétant les changements conformationnels liés à la levée de l'auto-inhibition du domaine FERM et donc l'activation de FAK ont permis de commencer à explorer cette question. Ces sondes consistent en une insertion de deux fluorophores à proximité des domaines FERM et kinase. Lorsque FAK est en conformation fermée, les domaines kinases et FERM interagissant, les fluorophores sont proches et le transfert d'énergie peut avoir lieu entre le fluorophore donneur et l'accepteur. Lorsque FAK s'ouvre, les fluorophores se séparent, limitant le transfert d'énergie. Une telle sonde a permis à Papusheva et al. de montrer qu'un changement conformationnel de FAK est observé en réponse à la stimulation d'intégrines (Papusheva et al., 2009). De plus, une sonde similaire a été utilisée pour montrer que la liaison de FAK au PtdIns(4,5)P2 induit une ouverture partielle de FAK permettant l'exposition du site d'autophosphorylation et ainsi le recrutement de Src qui induit alors l'ouverture totale et l'activation catalytique complète de FAK (Goñi et al., 2014). Les auteurs de cette étude suggèrent que ces effets permettent de faire le lien entre la signalisation des intégrines et l'ouverture de FAK, la production locale de PtdIns(4,5)P2 étant le résultat du recrutement de PIP5K γ (Phosphatidyl-4-phosphate-5-kinase, gamma) suite à l'activation des intégrines. Ainsi, l'activation des intégrines produit une augmentation locale de PtdIns(4,5)P2 autour des adhérences aboutissant à l'activation de FAK (Goñi et al., 2014). Enfin, une autre sonde FRET de FAK reflétant également l'ouverture de FAK a permis de suggérer qu'une augmentation du pH pourrait lier l'engagement des intégrines et la séparation des domaines kinase et FERM de FAK (Ritt et al., 2013 ; Choi et al., 2013; Lawson and Schlaepfer, 2013).

Parmi les autres candidats qui pourraient relier l'activation de FAK aux intégrines sont retrouvées les protéines kinase C (PKC). En effet, il a été montré dans des lignées CHO que

l'effet positif d'un ensemencement des cellules sur fibronectine sur le niveau de phosphorylation de FAK était augmenté par des activateurs de PKC (phorbols esters) et diminué par un inhibiteur de PKC (Calphostin C) (Vuori et al., 1993). De plus Disatnik et Rando, montrent que des activateurs de PKCs promeuvent l'activation de FAK et l'adhérence des cellules musculaire à la matrice probablement via l'activation depuis l'intérieur de la cellule de l'intégrine $\alpha 4$ (Disatnik et Rando., 1999). Ces inhibiteurs ou activateurs ne faisant pas de distinction entre les différents isoformes de PKC, ces études ne permettent pas de discriminer l'implication particulière des isoformes dans l'activation de FAK.

3.2.3.3. Dimérisation de FAK.

Une étude récente montre que FAK est capable de se dimériser aux adhérences via une interaction des domaines FERM. L'inhibition de cette dimérisation par mutation ponctuelle (W266A) empêche l'autophosphorylation de FAK en 397. Le lien exact entre cette dimérisation et le contrôle de l'ouverture de FAK (séparation FERM/kinase) reste à être établi (Brami-Cherrier et al., 2014).

L'ensemble de ces études permet de proposer des modèles d'activation de FAK en aval des intégrines, cependant les mécanismes précis restent à être élucidés.

En aval de son activation, FAK est capable de contrôler différents processus cellulaires.

3.3. Fonction de FAK.

3.3.1. Implication de FAK dans le développement.

FAK joue un rôle majeur durant le développement. En effet, l'expression de FAK est essentielle au développement embryonnaire, les souris *fak*^{-/-} mourant durant le développement. Cette létalité est liée à des défauts du développement du système cardiovasculaire, des délétions de FAK restreintes aux cellules endothéliales de ces souris étant également létales (Braren et al., 2006; Hall et al., 2011). Toujours dans le système cardiovasculaire, FAK a été impliquée dans le développement cardiaque du Xenope lisse, en

permettant la prolifération des myocytes (Doherty et al., 2010). En outre, elle joue un rôle dans le développement neural. En effet, des KO FAK conditionnels et inductibles chez la souris ont permis de montrer qu'elle est impliquée dans les processus de myélinisation mais également dans le branchement neuronal et la formation de synapses dans le système nerveux central (Forrest et al., 2009 ; Rico et al., 2004). Encore chez la souris, une délétion de FAK cette fois-ci dans des cellules épithéliales mammaires démontre que FAK est essentielle au développement de la glande mammaire durant la gestation (Nagy et al., 2007 ; Hall et al., 2011).

3.3.2. FAK et cancers : données cliniques

3.3.2.1. Surexpression.

La protéine FAK a été retrouvée surexprimée par immunohistochimie ou western blot dans les cancers des ovaires, de l'utérus, des reins, des poumons, du pancréas, du cerveau, du colon, de la peau, de la prostate et du sein (Yoon et al., 2015). Différents mécanismes sont à l'origine de ces surexpressions. Dans le cas du cancer du sein, Yom et al. ont constaté au niveau de tumeurs de patientes une forte corrélation entre la surexpression protéique de FAK et l'amplification du gène de FAK (Yom et al., 2010). Une telle corrélation a également été observée sur des tumeurs de l'ovaire ou de la prostate. Cependant, l'amplification génique de FAK ne semble pas toujours être à l'origine de la surexpression protéique. En effet, Canel et al. n'ont pas observé de corrélation entre la surexpression de FAK et son amplification génique au niveau de tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou. Observant plutôt sur des lignées cellulaires de ces types de cancers une corrélation entre la surexpression de la protéine FAK et son niveau d'ARNm, ils suggèrent une origine transcriptionnelle de la surexpression de FAK (Canel et al., 2006). Il a été montré que la transcription du gène de FAK (*PTK2*) est régulée négativement par la protéine p53 et positivement par le facteur de transcription NF-κB (Nuclear factor-κB ; Golubovskaya et al., 2004). Il est intéressant de noter que peu de mutations faux sens sont retrouvées au sein du gène *PTK2* dans les tumeurs (Sulzmaier et al., 2014).

3.3.2.2. Influence sur les pronostics.

L'association entre la surexpression de FAK et un mauvais pronostic a été constatée dans plusieurs cancers tels que ceux du côlon, de la thyroïde, de l'ovaire, de la tête et du cou, des poumons et du sein (Yom et al., 2011). Dans le cas du cancer du sein, la surexpression de FAK est observée par immunohistochimie sur des tumeurs de patientes dès le stade des carcinomes ductaux *in situ* suggérant que cette surexpression pourrait être associée aux événements précoces de la tumorigénèse mammaire (Lark et al., 2005). Elle est liée à différents indicateurs de mauvais pronostic tels qu'un fort index mitotique et un grade élevé (Lark et al., 2005). De plus, l'amplification du gène de FAK, *PYK2*, est corrélée à des durées de vie moindre des patientes atteintes de cancer du sein. Enfin, il est intéressant de noter que la surexpression de FAK dans les cancers du sein est préférentiellement retrouvée dans les cancers du sein triple-négatifs (Yom et al., 2011).

Il existe des exceptions notables à cette association surexpression de FAK/mauvais pronostic. Ainsi, une faible expression de FAK dans des cancers de l'utérus a été associée à de mauvais pronostics (Gabriel et al., 2006). De même, un niveau de FAK réduit dans des carcinomes biliaires a été associé à des tumeurs plus volumineuses, moins différenciées ainsi qu'à une présence accrue de lésions métastatiques (Ohta et al., 2006).

3.3.3. Rôles de FAK dans l'oncogénèse des cellules tumorales.

3.3.3.1. Implication de FAK dans la survie cellulaire.

Plusieurs études ont rapporté un effet négatif de FAK sur l'anoïkis, une forme d'apoptose induite suite au détachement des cellules de la matrice extracellulaire. Ainsi, Frisch et al., montrent dans des lignées rénales de chien (MDCK) que l'expression d'une FAK active confère aux cellules une résistance à l'anoïkis et que cet effet est dépendant de l'autophosphorylation Y397 et de l'activité kinase de FAK (Frisch et al., 1996).

De plus, un effet anti-apoptotique de FAK a également été rapporté dans des cellules de cancer du sein. Ainsi, Walsh et al montrent qu'une inhibition pharmacologique de FAK limite la croissance tumorale et augmente l'apoptose de cellules de lignées de cancer du sein MDA-

MB231 injectées dans le coussinet adipeux mammaires de souris sans affecter la prolifération dépendante des adhérences (Walsh et al., 2010).

Le contrôle de l'anoïkis par FAK pourrait passer par une signalisation passant du complexe FAK/Src à Akt et à Erk1/2 comme le montrent Bouchard et al. dans des lignées de cellules épithéliales de l'intestin humain (Bouchard et al., 2007). Le TGF β a été impliqué dans le contrôle en amont de l'effet de FAK sur l'anoïkis (Horowitz et al., 2006). L'effet anti-apoptotique de FAK pourrait également passer par un contrôle direct de facteurs pro-apoptotiques tels que p53 ou les kinases RIP (Receptor interacting protein ; Golubovskaya, 2014).

3.3.3.2. Implication de FAK dans la prolifération cellulaire.

L'effet positif de FAK sur la prolifération a initialement été observé dans des lignées de fibroblastes murins (Balb/c 3T3) ou des cellules endothéliales humaines (HUVEC). Ainsi, une inhibition de l'activité de FAK par surexpression du domaine C-terminal de FAK limite la prolifération de ces cellules (Gilmore et Romer, 1995). Cet effet de FAK pourrait être lié à un contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, Zhao et al montrent que la surexpression de FAK dans plusieurs lignées de fibroblastes accélère la transition G1/S et augmente l'expression de la cycline D1 tout en inhibant celle de p21. À l'inverse, un mutant dominant négatif de FAK inhibe cette transition et empêche la surexpression de la cycline D1 tout en augmentant celle de p21. De plus, ce mutant limite l'activation de Erk (Zhao et al., 1998). Cet effet de FAK sur la transition G1/S via un contrôle de Erk et de la cycline D1 a été confirmé dans différentes lignées cellulaires. D'autres mécanismes ont été également proposés, notamment une activation de JNK/c-Jun qui permettrait la progression G1/S (Lee et al., 2015). FAK contrôle aussi la prolifération des cellules via un effet direct sur p53 passant par une translocation nucléaire de FAK suivie de son interaction avec p53 via le domaine FERM, interaction facilitant la dégradation de p53. Par conséquent, FAK limite l'arrêt du cycle cellulaire induit par p53 dans des conditions de stress (Lim et al., 2008). Dans le cancer du sein, Provenzano et al. montrent que FAK médie les effets positifs d'une augmentation de rigidité d'une matrice de collagène sur la prolifération cellulaire (Provenzano et al., 2009).

Les effets de FAK sur la prolifération de cellules en culture ont été confirmés *in vivo* dans divers modèles murins de tumeurs de différentes origines (Lee et al., 2015). Par exemple, Pylayeva et al. montrent qu'une délétion spécifique de FAK dans la glande mammaire de souris exprimant l'oncogène PyMT (polyoma middle T protein) réduit la formation de tumeurs mammaires (Pylayeva et al., 2009). De plus, une telle délétion spécifique de FAK dans la glande mammaire de souris empêche la formation de tumeurs médiée par la délétion ou la mutation de p53 (Van Miltenburg et al., 2014). Enfin, Shibue et al. montrent que la signalisation intégrine $\beta 1$ /FAK est impliquée dans la prolifération de lignées tumorales mammaires formant des micrométastases pulmonaires chez la souris impliquant ainsi FAK dans l'adaptation au nouvel environnement métastatique (Shibue et al. 2009).

Pour terminer ce paragraphe sur les effets de FAK sur la prolifération, il est important de noter que malgré le nombre important d'études attribuant un rôle positif de FAK sur la prolifération, le groupe de Christopher Chen a montré que FAK peut avoir un rôle négatif sur la prolifération dans des cellules adhérant faiblement au substrat (Pirone et al., 2006). Ces travaux mettent en avant à la fois le rôle de FAK en tant que senseur de l'état d'adhérence des cellules, mais aussi l'importance de la prise en compte du contexte, ici de l'état d'adhérence au sein du même type cellulaire, dans l'étude des effets de FAK.

3.3.3.3. Implication de FAK dans la migration cellulaire.

L'implication de FAK dans la migration cellulaire a été pressentie avec l'observation d'une augmentation de l'activation de FAK durant la migration de cellules endothéliales en culture (Romer et al., 1994). Depuis, ce rôle a été confirmé et précisé dans de nombreuses lignées de cellules en culture et la migration est aujourd'hui la fonction de FAK la mieux décrite. Ainsi, FAK est impliquée dans la plupart des étapes de la migration cellulaire vues au chapitre précédent (**Figure 18**).

3.3.3.3.1. Polarisation des cellules en migration.

Durant la migration, la cellule doit former une protrusion dans une direction correspondant au sens de la migration. Ceci implique la localisation spécifique de l'activité des Rho GTPases et de leurs effecteurs (GEFs et GAPs) au sein de la cellule en migration. FAK a été impliquée dans ces processus de polarisation. Par exemple, Tomar et al. montrent sur diverses cellules en migration durant le processus de comblement de blessure, que FAK est nécessaire à la mise en place d'une polarité reflétée par la réorientation de l'appareil de Golgi entre le noyau et le front de migration. Ce contrôle serait permis par l'activation de FAK par les intégrines qui permettrait la formation d'un complexe de FAK avec p120RasGAP et p190RhoGAP au front des cellules en migration (Tomar et al., 2009).

3.3.3.3.2. Dynamique des adhérences à la matrice.

La migration de cellules nécessite une régulation spatio-temporelle du cycle d'assemblage/désassemblage des adhérences à la matrice qui implique la gestion d'un équilibre entre le recrutement et la dissociation de protéines au sein de ces complexes.

3.3.3.3.2.1. *Assemblage des adhérences.*

L'inhibition de FAK dans des fibroblastes (FAK^{-/-}) ou même des cellules de cancer du sein (inhibiteurs de l'activité kinase) n'empêche pas la formation d'adhérences dans ces cellules (Ilic et al., 1995 ; Bijian et al., 2013). Ainsi, FAK n'est pas absolument nécessaire à la formation d'adhérences. Cependant Nader et al, ont montré récemment que FAK est impliquée dans le réassemblage d'adhérences de fibroblastes (NIH3T3) lors d'un essai désassemblage/réassemblage au nocodazole. Cet essai consiste à inhiber la polymérisation des microtubules via le traitement au nocodazole, ce qui a pour conséquence de stabiliser les adhérences et d'empêcher leur désassemblage. Après le retrait du nocodazole, la repolymérisation des microtubules induit un désassemblage synchronisé des adhérences suivi d'un réassemblage progressif. Les auteurs montrent que l'activité kinase de FAK est

nécessaire à ce réassemblage. Les effets positifs de FAK sur le réassemblage seraient permis par la capacité de FAK à maintenir dans les vésicules d'endocytose les intégrines activées lors du recyclage des adhérences (Nader et al., 2016).

3.3.3.3.2.2. *Recrutement de FAK aux adhérences*

Le modèle classiquement décrit concernant l'ordre des événements nécessaires à la formation d'une adhérence est le suivant: la liaison des intégrines à la MEC provoque le recrutement au niveau de leurs domaines cytoplasmiques de la paxilline et de la taline, une protéine d'échafaudage contenant un domaine FERM. Le recrutement aux adhérences de ces deux protéines permet ensuite celui de FAK. Cependant, ce modèle est controversé.

Ainsi, Lawson et al. montrent en 2012 que la taline n'est plus recrutée aux adhérences naissantes de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) ou des cellules humaines de carcinomes ovarien dont l'expression de FAK est inhibée (FAK -/- ou « knockdown »). De plus,, l'inhibition de la taline dans des cellules HUVECS (human umbilical vein endothelial cells) n'empêche pas la localisation de FAK aux adhérences naissantes. Qui plus est, la localisation de la taline aux adhérences de MEFS n'est pas empêchée par un mutant ne pouvant plus se lier à l'intégrine $\beta 1$ alors qu'elle l'est par un mutant ne pouvant plus se lier à FAK. Ce dernier mutant n'empêche pas l'activation de FAK mais affecte la nature des adhérences formées, qui sont alors plus nombreuses, moins dynamiques et plus larges (Lawson et al., 2012). A l'inverse, Wang et al. montrent dans des cellules épithéliales mammaires murines (FSK7) que la déplétion de la taline empêche la localisation de FAK aux adhérences. Cependant, il faut noter que la distinction faite par Lawson et al., entre les adhérences naissantes et matures n'est pas retrouvée dans cette étude (Wang et al., 2011).

Concernant, la dépendance du recrutement de FAK à la paxilline, Tachibana et al., montrent qu'un mutant de FAK incapable de se lier à la paxilline ne se localise pas aux adhérences formées par des fibroblastes de souris (Swiss 3T3 cells) (Tachibana et al., 1995).

Inversement, Hagel et al. montrent dans une autre lignée de fibroblastes murins que la délétion de la paxilline n'inhibe pas complètement la localisation de FAK aux adhérences, bien que celle-ci soit réduite (Hagel et al., 2001). FAK n'est pas non plus essentielle au

recrutement de la paxilline aux adhérences, des fibroblastes FAK^{-/-} présentant toujours des adhérences riches en paxilline (Lawson et al., 2012). De plus, Hu et al observent dans des cellules endothéliales en migration que FAK est incorporée avant la paxilline dans des adhérences naissantes au front de migration (Hu et al., 2014).

Ces différentes études dénotent de la complexité des mécanismes à la base de la formation des adhérences et ainsi de la difficulté qu'il y a à définir un modèle type d'ordre de recrutement des protéines, qui semble varier selon le type cellulaire, le type d'adhérences mais qui pourrait également impliquer des phénomènes de compensation des différents mutants utilisés.

3.3.3.3.2.3. *Désassemblage des adhérences.*

La migration cellulaire requière le désassemblage des adhérences à la matrice. À l'arrière, ce désassemblage permet le décrochage et la translocation du corps de la cellule vers l'avant. Au front, les nouvelles adhérences formées subissent un processus de maturation ou de désassemblage, le désassemblage accompagnant la formation de nouvelles adhérences à mesure que de nouvelles protrusions apparaissent (*cf chapitre sur l' Invasion*). FAK joue un rôle essentiel dans ces processus.

En effet, des cellules tronquées de FAK (FAK^{-/-}) présentent une augmentation du nombre et de la taille des adhérences focales combinée à des défauts de migration (Ilic et al., 1995, Mitra et al., 2006). De plus, Webb et al. montrent sur des MEFs que la délétion de FAK diminue fortement le turnover des adhérences dans les régions protrusives de ces cellules (front de migration) : le désassemblage de ces adhérences est beaucoup plus lent dans les cellules FAK^{-/-} que les cellules wt ((Webb et al., 2004)).

Lorsque FAK est activée, l'autophosphorylation sur sa tyrosine 397 permet le recrutement et la phosphorylation de Src qui phosphoryle FAK sur ses tyrosines 576/577. Le complexe FAK/Src recrute et phosphoryle alors différents effecteurs dont la paxilline. Ces évènements ont été impliqués dans le désassemblage des adhérences. Ainsi, l'expression d'une FAK Y397F qui ne peut être phosphorylée à ces sites ralentit le désassemblage des adhérences

(Webb et al., 2004). De plus, les auteurs observent que FAK phosphorylée sur la tyrosine 397 est située dans les petites adhérences dynamiques du front de migration. Cette phosphorylation créant un site de liaison pour Src, la déplétion de cette protéine, ou une inactivation de son activité kinase, induit également un ralentissement du désassemblage des adhérences (Webb et al., 2004). Qui plus est, la déplétion de la paxilline ou l'expression de mutants non-phosphorylables (notamment sur la tyrosine 118 phosphorylée par FAK) ralentit également le désassemblage des adhérences. Ainsi, l'ensemble des résultats de cet article suggère fortement que les premiers événements suivant l'activation de FAK sont impliqués dans le contrôle de la dynamique des adhérences (Webb et al., 2004).

En aval de ces premières étapes d'activation, le complexe FAK/Src est capable de réguler le turnover des adhérences en affectant des événements protéolytiques à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Ainsi, dans des fibroblastes, FAK a été associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de différentes MMP (principalement les MMP-2 et MMP-9) (Hsia et al., 2003). La protéolyse de la matrice permise par FAK libère les intégrines liant cette matrice pouvant provoquer la dissociation des complexes d'adhérences (Mitra et al., 2006). Concernant le contrôle de mécanismes protéolytiques intracellulaires, FAK régulerait l'activité de la calpaïne, une protéase calcium-dépendante, localisée aux adhérences et capable de cliver les composants des complexes d'adhérences tels que FAK ou la taline (Mitra et al. 2006). En effet, Carragher et al ont observé que l'activité de la calpaïne est réduite dans des MEFs déplétés pour FAK (Carragher et al., 2003). Un an plus tard, ils précisent ces effets et montrent que les phosphorylations de Src sur FAK sont nécessaires au turnover des adhérences et à la migration cellulaire, en favorisant la formation d'un complexe calpaïne2-FAK-p42ERK-Src qui pourrait réguler l'activité protéase de la calpaïne 2 et ainsi la protéolyse de FAK et le turnover des adhérences (Westhoff et al., 2004).

Le contrôle de la dynamique des adhérences par FAK a également été associé à une régulation du cytosquelette. Aussi, Webb et al. montrent que FAK activée est capable de réguler Erk et MLCK qui en augmentant la contractilité de l'actomyosine induirait le désassemblage des adhérences de MEFs (Webb et al., 2004). A l'inverse, Ren et al. ont montré que des fibroblastes FAK-/- présentent une activité élevée de la petite GTPase Rho qui ralentirait le turnover des adhérences (Ren et al., 2000). FAK a également été impliquée dans le désassemblage des adhérences induite par les microtubules. En effet, les

adhérences formées suite à un traitement au nocodazole ne se désassemblent pas suite aux lavages dans des fibroblastes FAK-/- contrairement au wt dont les adhérences se désassemblent toutes. FAK permettrait ce désassemblage induit par les microtubules en recrutant la dynamine aux adhérences, une GTPase impliquée dans les processus d'endocytose (Ezratty et al., 2004).

FAK pourrait également médier le désassemblage des adhérences en étant le substrat de différentes phosphatases qui permettraient ainsi la dissociation des complexes d'adhérences. Cependant, l'implication précise des phosphatases dans ce processus reste à être établie (Nagano et al., 2011).

Dans le cancer du sein, la comparaison du taux d'assemblage et de désassemblage des adhérences de lignées de cancer du sein plus ou moins invasives, montre que le taux de désassemblage des adhérences est beaucoup plus élevé dans des lignées invasives comparé à celui des moins invasives, sans différences significatives dans les taux d'assemblage (Bijian et al., 2013). De plus, les auteurs de cette étude montrent qu'une drogue inhibant l'activité kinase FAK réduit fortement le désassemblage des adhérences de cellules d'une lignée invasive de cancer du sein (MDA231-M2) mais aussi l'invasion et la migration de ces cellules, *in vitro* et également *in vivo* en limitant la formation de métastases (Bijian et al., 2013). Une autre étude a également impliqué positivement FAK et Src dans le désassemblage des adhérences de cellules de cancer du sein en aval du récepteur HER2 (Xu et al., 2009). Cependant, il faut noter que les travaux étudiant l'implication de FAK dans la dynamique des adhérences de cellules de cancer du sein sont peu nombreux, la plupart des études ayant été faites sur des fibroblastes.

3.3.3.3.3. Rôles de FAK dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.

La migration cellulaire implique une réorganisation du cytosquelette nécessaire à la formation de protrusions et à la rétraction de l'arrière de la cellule. FAK a été associée au contrôle de ces processus.

3.3.3.3.1. Les protrusions

Dans le cancer du sein, il a été montré sur plusieurs lignées (MtLn3 et MDA-MB-231) que FAK régule négativement la formation d'invadopodes actifs, dans lesquels elle ne se localise pourtant pas (Chan et al., 2009). Dans des fibroblastes de souris, FAK activée est nécessaire à la formation de lamellipodes. Les auteurs ont exploré les mécanismes d'un tel contrôle: FAK dans son état inactif interagit via son domaine FERM avec Arp3. Suite à son activation (phosphorylation sur Y397), Arp3 se détache de FAK, évènement qui est associé à la formation de lamellipodes aux niveaux d'adhérences naissantes en formation (Serrels et al., 2007).

3.3.3.3.2. Les Rho-GTPases

FAK est également capable de contrôler le cytosquelette des cellules en migration en impactant sur l'activité des petites Rho GTPases. Dans des fibroblastes FAK^{-/-}, l'activité de Rho est augmentée (Ren et al., 2000). De même, l'absence de FAK dans des macrophages est liée à une augmentation de l'activité de Rac et à des défauts de formation des lamellipodes (Owen et al., 2007). La régulation des activités des Rho GTPases par FAK est plus ou moins directe.

Ainsi, FAK, une fois activée et liée à Src, pourrait contrôler la formation de protrusion et l'activité de Rac via l'interaction et la phosphorylation de p130Cas, une protéine d'échafaudage retrouvée aux adhérences (Carry et al., 1998). Une fois phosphorylée, p130Cas peut interagir avec des protéines contenant des domaines SH2 tels que Crk, et ce complexe régule la formation de protrusions via DOCK 180 (une GEF de Rac) et Rac. De la même façon, il a été montré que la paxilline est capable de recruter une GEF et un effecteur de Rac et Cdc42 (β -Pix et PAK, p21 GTPase-activated Kinase respectivement) aux adhérences naissantes de fibroblastes. Or l'expression d'une paxilline incapable de constituer ce complexe affecte la capacité des fibroblastes à former des lamellipodes (Turner et al., 1999). Aussi, FAK, en recrutant et en phosphorylant la paxilline aux adhérences, pourrait participer à la formation de lamellipodes en recrutant aux adhérences les activateurs et effecteurs de Rac et Cdc42.

FAK peut aussi interagir directement avec les GEFs et GAPs des Rho GTPases. Aussi, une GAP, GRAF (GTPase regulator associated with FAK) se lie à la région riche en proline en C-terminal de FAK. Cette GAP a été associée à l'inhibition de l'activité de RhoA dans des fibroblastes (Taylor et al., 1999 ; Schaller, 2010). FAK est également capable d'interagir avec et de phosphoryler une GEF de Rho, p190-RhoGEF, permettant ainsi sa localisation aux adhérences de MEFs et l'activation de Rho en aval (Lim et al., 2008). Le même groupe a également montré que FAK interagit indirectement avec p190RhoGAP et qu'elle permet la localisation de cette GAP aux adhérences situées au front de migration dans le lamellipode (Tomar et al., 2009). Les auteurs proposent que FAK régule les cycles d'activation et d'inactivation de RhoA via son association sélective avec ses GEF et GAP durant la formation des adhérences et du lamellipode (Tomar and Schlaepfer, 2009).

3.4. FAK en thérapie.

La prise en considération des différents rôles de FAK dans la progression tumorale a conduit à sérieusement envisager l'inhibition de FAK comme potentielle thérapie en cancérologie.

Dans cet objectif, un nombre important d'inhibiteurs pharmacologiques ont été développés tels que des compétiteurs de l'ATP, des petits inhibiteurs de l'activité kinase de FAK, des inhibiteurs ciblés de la phosphorylation sur Y397 de FAK et même des inhibiteurs de sa fonction de protéine d'échafaudage visant à empêcher son interaction avec divers partenaires (Lee et al., 2015).

Certains de ces inhibiteurs, dont l'efficacité a été validée par des études précliniques (tailles des tumeurs, migration cellulaire, cf 3.3.), ont été ou sont actuellement testés dans des essais cliniques de phase I et II.

Un des plus avancés est un compétiteur de l'ATP, le Defactinib ou VS-6063. Un essai clinique de phase II mené par Verastem sur des patients atteints de carcinomes pulmonaire à cellules non petites et porteurs de mutation sur le gène KRAS semble encourageant, 25% des patients traités présentant une diminution de la taille des tumeurs (essai clinique NCT01951690).

Afin de limiter les phénomènes de résistances ou de compensation, des combinaisons thérapeutiques alliant ces inhibiteurs de FAK à d'autres inhibiteurs sont envisagées. Ainsi, un essai clinique de phase II est actuellement en cours sur des patients atteints de méningiomes testant l'efficacité de la combinaison de l'inhibiteur de FAK GSK2256098 avec un inhibiteur de la voie Hedgehog, le Vismodegib (essai clinique A071401).

Concernant le cancer du sein, l'efficacité de plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de FAK a été démontré lors de tests précliniques dans des modèles murins, à la fois sur la prolifération des cellules tumorales, mais également sur la formation de métastases et la survie. L'un d'entre eux, un compétiteur de l'ATP, est allé jusqu'en essai clinique de phase I sur des patientes de cancer du sein (Lee et al. , 2015).

Il faut noter que la plupart des essais cliniques testant des inhibiteurs de FAK rapportent des effets secondaires relativement importants tels que vomissements, nausées, diarrhées, asthénies ou même œdèmes (Lee et al., 2015 ; Sulzmaier et al. 2014). Ceci est probablement lié au fait que l'expression et l'activité de FAK ne sont pas restreintes aux cellules tumorales.

3.5. Conclusions du chapitre III.

En conclusion de ce troisième chapitre, il apparaît que FAK est un régulateur majeur de la migration cellulaire. Ainsi, en associant ce rôle à ses effets sur la survie et la prolifération cellulaire, il n'est pas étonnant de constater son importance dans la progression tumorale. Concernant sa régulation, il est aujourd'hui admis que FAK peut être activée en aval des intégrines ou des récepteurs aux facteurs de croissance et que son activation requière la levée de son auto-inhibition. Cependant, notre compréhension des mécanismes reliant ces récepteurs à l'ouverture de FAK, de même que ceux permettant de relier son activation à ses effets biologiques est loin d'être complète. Nos résultats indiquent que la PKC θ est impliquée dans ces processus.

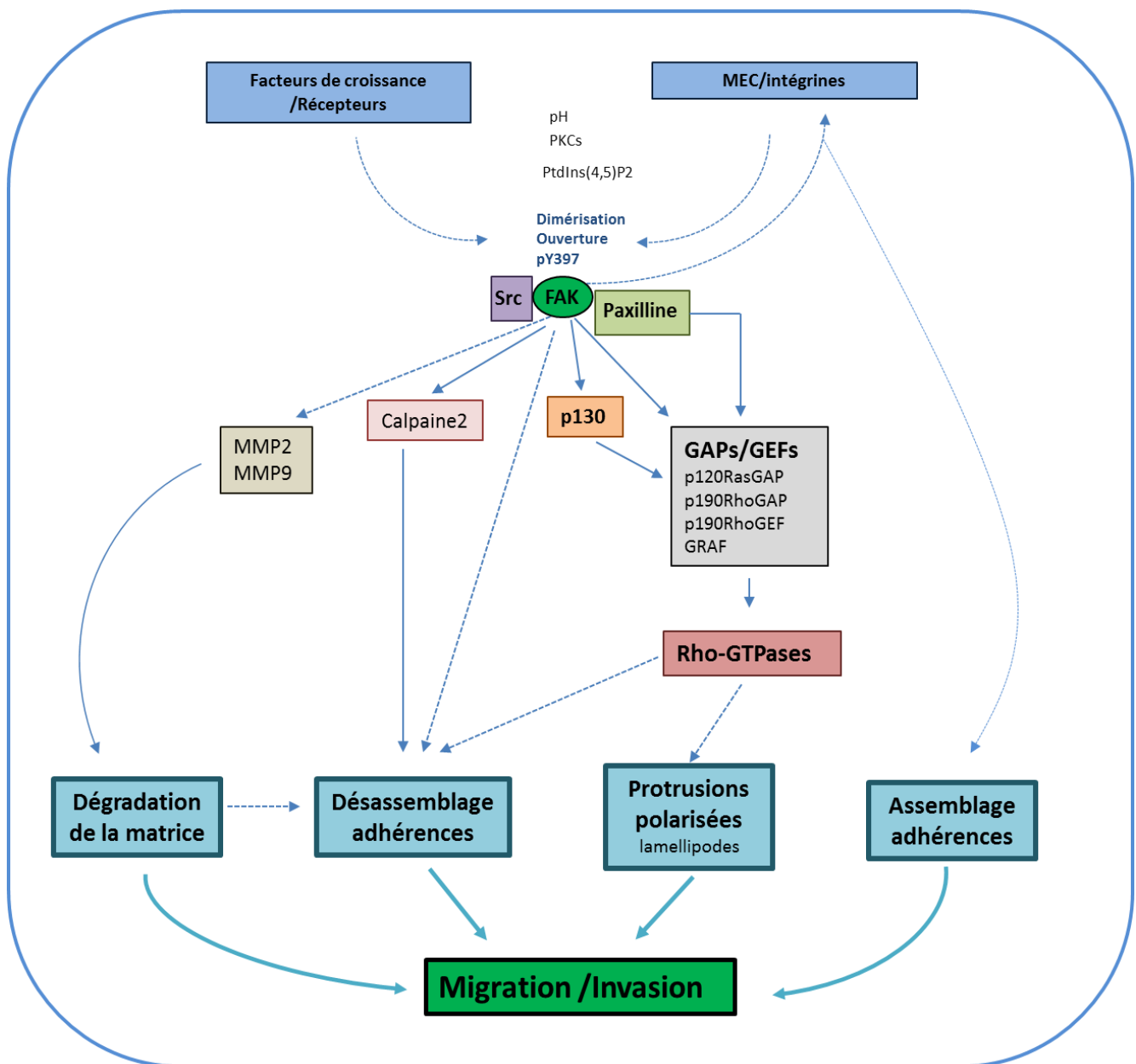


Figure 18. Vue d'ensemble du contrôle de la migration/invasion cellulaire par FAK.

En aval des récepteurs aux facteurs de croissance et/ou des intégrines, différents signaux permettent l'activation de FAK autorisant notamment la séparation du domaine FERM de son domaine kinase et son autophosphorylation. Cette activation permet le recrutement de Src et de la paxilline qui vont participer aux effets de FAK en aval. FAK régule plus ou moins directement des GEFs et GAPs des RhoGTPases qui régulent principalement la formation de protrusions polarisées. FAK et ses partenaires ont été fortement impliquées dans le désassemblage des adhérences via une régulation des protéases (MMP2 et 9, Calpaine 2). FAK participe également à l'assemblage des adhérences notamment en permettant aux intégrines endocytées de maintenir une conformation active.

Chapitre IV : La PKC thêta (PKC θ)

4.1 La famille des PKCs.

4.1.1 Structures.

Les PKCs sont des sérines thréonines kinases fortement conservées chez les eucaryotes et régulant de nombreux processus cellulaires (Rosse et al., 2010). La première purification de PKC a été obtenue depuis des extraits des cerveaux bovins (Takai et al., 1977). D'abord considérée comme une entité unique, la PKC a été alors définie comme une kinase indépendante des nucléotides cycliques mais dépendante du calcium et de lipides (Takai et al., 1977 ; Inoue et al., 1977). Par la suite, les ADNc d'autres PKCs ont été clonés et les PKCs sont depuis considérées comme une famille d'enzymes (Zhang et al., 2013).

Ainsi, chez l'humain, la famille des protéines kinases C (PKC) regroupe dix sérine/thréonine kinases aux structures similaires: elles comprennent toutes en C terminal un domaine catalytique incluant le site de liaison au substrat et à l'ATP, relié par un domaine variable à un domaine régulateur, contenant un pseudo-substrat auto-inhibiteur et des sites de liaison à la membrane C1 et C2 (Kang et al., 2012). Elles constituent environ 2% du kinome humain et possèdent des rôles globalement peu redondants (Rosse et al., 2010).

Des différences dans la structure de leurs domaines régulateurs et leurs modes d'activation, tout particulièrement leur sensibilité à certains seconds messagers définissent trois sous-familles : les PKC classiques, qui comprennent PKC α , PKC γ , PKC β I et β II (β I et β II étant des produits d'épissage alternatifs), les PKC nouvelles (PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , PKC η) et les PKC atypiques (PKC ζ , PKC ι) (**Figure 19**).

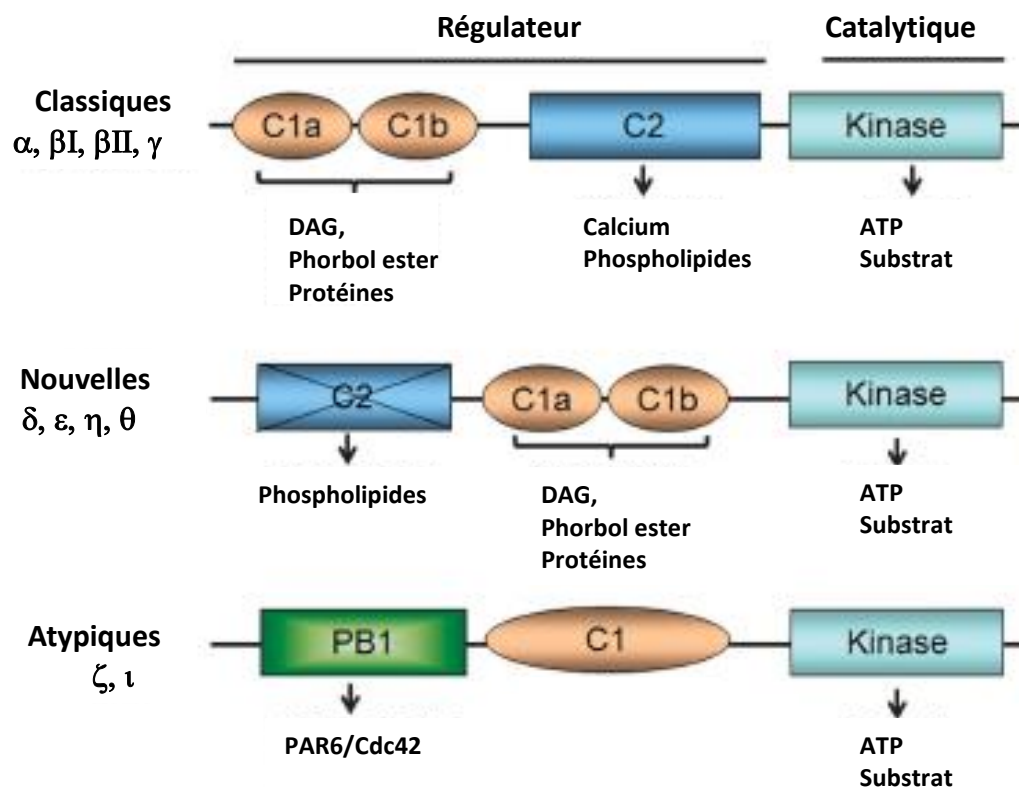


Figure 19. Structure des PKCs.

Les PKCs sont des sérine–thréonine kinases comprenant en C-terminal un domaine catalytique liant l'ATP et le substrat et en N-terminal un domaine régulateur. La structure de ce domaine régulateur définit trois sous-familles et différents modes d'activation. Les PKC classiques (α , β I, β II, γ) comprennent dans leur domaine régulateur un sous domaine C2 capable de lier le calcium et les phospholipides et un sous domaine C1 capable de lier le DAG et les phorbol-esters. Le domaine régulateur des PKCs nouvelles (δ , ϵ , η , θ) contient un domaine C1 capable de lier le DAG et un domaine C2 incapable de lier le calcium. Celui des atypiques (ζ , ι) contient un domaine C1 incapable de lier le DAG et un domaine d'interaction protéine/protéine capable de se lier au complexe PAR6/Cdc42.

D'après Garg et al., 2014

4.1.2. Activation

Les PKCs sont activées en réponse à certaines hormones, facteurs de croissance et neurotransmetteurs mais également de façon irréversible par des promoteurs de tumeurs, les phorbols-esters (Mochly-Rosen et al., 2012).

Le modèle d'activation des PKC, établi à partir d'analyses de divers mutants considère que dans leur état inactif, les PKC sont en conformation fermée: le domaine régulateur interagit avec le domaine catalytique principalement via une interaction du pseudosubstrat avec le site de liaison au substrat. Le pseudo-substrat est une séquence correspondant à un site de reconnaissance de substrat de PKC dépourvue de serine ou de thréonines phosphorylable, empêchant ainsi l'accès de substrats à la région catalytique. La liaison de seconds messagers ou d'effecteurs allostériques aux domaines régulateurs permet le détachement du pseudosubstrat du domaine de liaison au substrat (Rosse et al., 2012).

Ainsi, l'activation des PKCs classiques est régulée par le calcium et le diacylglycérol (DAG, un second messenger lipidique), leurs domaines N-terminaux comprenant un domaine C1 qui lie le diacylglycérol et les phorbols esters et un domaine C2, qui se lie aux phospholipides de façon calcium dépendante. Le domaine régulateur des PKCs nouvelles contient également les domaines C1 et C2, cependant le domaine C2 ne contient pas les résidus permettant la liaison au calcium. Aussi, l'activité des PKCs nouvelles est régulée par le DAG et non le calcium. Les PKC atypiques ne contiennent pas de domaine C2 et contiennent un domaine C1 atypique ne se liant pas au diacylglycérol. Ainsi, leur activation dépend d'une interaction avec le complexe de PAR6/Cdc42 (partitioning defective 6) auquel elles se lient via un domaine d'interaction protéine/protéine PB1 (Phox and Bem 1) (Steinberg, 2008 ; Rosse et al., 2012).

Au sein de la cellule, le modèle classiquement décrit d'activation des PKCs basé sur l'étude de l'activation de PKC α est le suivant: la liaison de facteurs de croissance, d'hormones ou neurotransmetteurs à des récepteurs membranaires de type récepteurs tyrosines kinases ou récepteurs couplés à la protéine G aboutit à l'activation de phospholipases C (PLC). Les PLCs hydrolysent alors le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate membranaire en DAG membranaire et inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) soluble qui permet la libération du calcium provenant du réticulum endoplasmique. Le DAG et le calcium ainsi produits permettent le

recrutement à la membrane des PKCs (classiques et nouvelles) via leurs domaines régulateurs. Cette interaction avec la membrane induit un changement conformationnel qui expose les sites de liaisons aux substrats et favorise l'activation de la fonction kinase : les PKCs sont alors à même de phosphoryler leurs cibles locales (Steinberg, 2008).

Cependant, ce modèle n'explique pas certaines localisations intracellulaires des PKCs activées. En effet, en réponse aux phorbols-esters ou à la stimulation de récepteurs, les PKCs activées peuvent se redistribuer au niveau du cytosquelette, de la membrane nucléaire, dans la mitochondrie, sur l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et à l'intérieur du noyau. Ces localisations seraient médiées par des interactions protéines-protéines (Mochly-Rosen et al., 2012).

Qui plus est, l'activité des PKCs peut être régulée par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations qui peuvent parfois contourner la nécessité de liaisons aux messagers secondaires. Ainsi, certaines fonctions des PKCs ne sont pas médiées par le DAG et pourraient être uniquement la conséquence de phosphorylations ou d'interactions avec d'autres partenaires spécifiques (Rosse et al., 2012).

4.1.3. Fonctions

Les phorbols esters, capables de mimer de façon continue l'action du DAG en se liant aux domaines C1, ont été utilisés pour étudier le rôle des PKCs. Ainsi, différentes fonctions leurs ont été attribuées telles que la régulation de la prolifération et la mort cellulaire, de la transcription et la traduction de gènes, de canaux ioniques et de récepteurs, mais aussi de la morphologie et la migration cellulaire et des interactions cellules/cellules ou cellules/matrice (Mochly-Rosen et al., 2012). Cependant, les phorbols esters activent de façon continue et peu spécifique l'ensemble des PKCs nouvelles ou classiques et d'autres études ont donc été nécessaires pour impliquer précisément des isozymes particuliers dans ces diverses fonctions.

Ce qui ressort de ces nombreuses études est que d'un isoforme à l'autre les effets peuvent être opposés tout comme une même PKC peut avoir des rôles distincts suivant le type

cellulaire étudié. Par exemple, PKC δ , une PKC nouvelle est généralement pro-apoptotique, alors que PKC ϵ , une autre PKC nouvelle promeut la survie et la prolifération de nombreux types cellulaires (Griner et Kazanietz, 2007). Ou encore, PKC β régule positivement la prolifération des cellules de cancer du poumon alors qu'elle inhibe la croissance de lignées de cancer du côlon (Urtreger et al., 2012). Ces études ont ainsi également mis en avant l'importance des PKCs dans les processus d'oncogenèse, importance pressentie par le fait que les phorbols-esters fortement carcinogènes sont également des activateurs des PKCs. Aussi, une modification des niveaux d'expression de plusieurs PKCs a été observée dans de nombreux cancers dont ceux du sein, de la prostate, de la vessie, du cerveau, du rein ou des tumeurs gastro-intestinales (Griner et Kazanietz, 2007). Il apparaît que dans la plupart des cas ces différences d'expression ne sont pas associées à des différences de niveau des ARNm correspondants (Garg et al., 2014).

Dans le cancer du sein, les PKC α et ϵ sont souvent surexprimées alors que la PKC η est sous exprimée. Ces modifications de niveaux d'expression de ces PKC sont toutes trois corrélées à une augmentation du grade des tumeurs (Pham and Tonetti, 2016 ; Griner et Kazanietz, 2007).

Les mécanismes à la base des effets de PKC α ont été explorés. Ainsi, Ways et al montrent qu'une surexpression ectopique de PKC α dans des lignées de cancer du sein MCF7 aboutit à une augmentation du taux de prolifération et de la capacité de ces cellules à former des tumeurs ou des métastases après avoir été injectées dans des souris immunodéficientes (Ways et al., 1995). De plus, les auteurs constatent que cette surexpression est associée à une diminution de l'expression du récepteur à l'œstrogène, résultat concordant avec une étude plus récente de Tonetti et al. montrant que la surexpression de PKC α est associée à un statut triple négatif des tumeurs mammaires (Tonetti et al., 2012). PKC α a également été associée à une augmentation de la motilité de cellules tumorales mammaires. Cet effet a notamment été relié à une augmentation de l'activité de la MMP-9 mais les mécanismes liant cette augmentation à PKC α n'ont pas été entièrement élucidés (Kim et al., 2011).

Concernant le rôle de PKC ϵ , il a été observé qu'elle est capable d'inhiber l'entrée en apoptose de cellules de cancer du sein MCF7 en empêchant la translocation dans la mitochondrie de Bax (Bcl2 associated X) une protéine pro-apoptotique (Lu et al., 2007). De

plus, sa surexpression dans des cellules tumorales murines (LM3) augmente la capacité de ces cellules à former des métastases pulmonaires (Grossoni et al., 2009). Jain et Basu ont quant à eux montré que la surexpression de PKC ϵ dans des lignées mammaires MCF10A induit la migration des cellules probablement via sa capacité à promouvoir une transition épithélio-mésenchymateuse (Jain et Basu, 2014). Son expression dans les cancers du sein a par ailleurs été associée avec l'absence d'expression des récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone (Pan et al., 2005 ; Garg et al., 2014) et une amplification du gène codant pour PKC ϵ (PRKCE) a été constatée dans les cancers du sein triple-négatifs.

Récemment, l'équipe a montré qu'une autre PKC est surexprimée dans les cancers du sein triple-négatifs : la PKC θ .

4.2. La PKC thêta : structure et régulation

Au début des années 90, trois groupes indépendants ont cloné l'ADNc humain et souris d'un nouveau membre de la famille des PKCs : la PKC thêta (PKC θ) (Osada et al., 1992 ; Baier et al., 1993 ; Chang et al., 1993). Chez l'humain, son gène est situé sur le chromosome 10 et code pour une protéine de 706 acides aminés, d'un poids moléculaire d'environ 82kDa (Zhang et al. 2013). Contrairement à la plupart des PKCs qui présentent une expression quasi-ubiquitaire, l'expression de PKC θ est particulièrement restreinte. Ainsi, elle est fortement exprimée uniquement dans les lymphocytes T, les muscles squelettiques et les plaquettes (Chang et al., 1993, Baier et al., 1993 ; Osada et al., 1992).

4.2.1. Structure

Comme les autres membres de la famille des PKC, PKC θ comprend un domaine régulateur en N-terminal (acides aminés 1 à 378) et un domaine catalytique en C-terminal (acides aminés 379-706). La région charnière V3 qui contient un motif riche en proline, s'étend des acides aminés 291 à 378, et est unique à PKC θ (Wang et al., 2012 ; **figure 20**).

Le domaine régulateur comprend un domaine de type C2 mais incapable de lier le calcium. Sur ce domaine C2, se situe un site de phosphorylation spécifique à PKC θ , la tyrosine 90. A la suite de ce domaine, se trouvent deux domaines C1 en tandem et riches en cystéines liant le

DAG, C1a et C1b d'environ 50 résidus chacun. Le domaine C1b présente une affinité pour le DAG largement supérieure à celle de C1a. Le domaine C1a contient le pseudosubstrat de PKC θ (RRGAIKQA), essentiel à la régulation de son activité (Wang et al., 2012).

La structure du domaine catalytique de PKC θ a été résolue par cristallographie (Xu et al., 2004). Ainsi, son domaine kinase comprend deux lobes : un petit lobe en N-terminal (acides aminés 377-461) et un plus grand lobe en C-terminal (466-696). Entre les deux lobes se situent le site de liaison à l'ATP et au substrat ainsi que la boucle d'activation qui comprend la thréonine 538 dont la phosphorylation est essentielle à l'activité kinase de PKC θ (Xu et al., 2004). D'autres sites de phosphorylation sont également compris dans le domaine C-ter de PKCs : les sérines 695 et 676 retrouvées sur d'autres PKCs (Zhang et al., 2013).

4.2.2. Activation

En tant que PKC nouvelles, l'activation de PKC θ requiert la liaison au DAG qui diminue l'interaction du pseudo substrat avec le site catalytique. Mais l'activation de PKC θ et la régulation de sa localisation membranaire impliquent d'autres événements, principalement des phosphorylations.

4.2.3. Phosphorylations

La phosphorylation la mieux étudiée de PKC θ est celle sur la thréonine 538 au sein de la boucle d'activation du domaine catalytique. Elle a été observée via l'utilisation d'anticorps spécifiques et par spectrométrie de masse (Liu et al., 2002 ; Czerwinski et al., 2005). Cette phosphorylation est fortement impliquée dans l'activité kinase de PKC θ , un mutant non phosphorylable à ce site (T538A) présentant une réduction de plus de 100 fois de son activité *in vitro* (Liu et al., 2002). Ainsi, cette phosphorylation est fréquemment utilisée comme marqueur de l'activation de PKC θ (Wang et al., 2012). Elle permettrait une stabilisation de la boucle d'activation et pourrait être le résultat d'une autophosphorylation probablement en *trans*, un mutant « kinase dead » (K409W) abolissant la phosphorylation (Liu et al., 2002). Son importance a été démontrée dans les lymphocytes T : un mutant non phosphorylable, PKC θ T538A, perd ses effets activateurs sur les facteurs de transcription NF- κ B et NF-AT (Liu et al., 2002). La phosphorylation sur T538 est induite durant l'activation des lymphocytes T en aval du récepteur des cellules T (T Cell receptor, TCR). Plus précisément,

elle peut être directement phosphorylée sur ce site par GLK (Germinal center kinase-like kinase, MAP4K3) une sérine thréonine kinase activée en aval des TCR dans les lymphocytes T (Chuang et al., 2011).

Une phosphorylation sur la sérine 695 de PKC θ qui serait le résultat d'une autophosphorylation a également été décrite (Liu et al., 2002). Dans des lignées de lymphocytes T (Jurkat), elle est induite en aval de la stimulation des récepteurs au TCR (Villalba et al., 2002). Un mutant non phosphorylable à ce site (S695A) affecte l'activité kinase de PKC θ *in vitro* (Liu et al., 2002). Qui plus est, cette phosphorylation pourrait également réguler la localisation de PKC θ dans les cellules étant donné que seule la PKC θ associée aux membranes est phosphorylée à ce site (Villalba et al., 2002).

Des phosphorylations sur tyrosines ont également été observées sur PKC θ dans des lymphocytes T humains suite à la stimulation des TCR (Liu et al., 2000). Précisément, LCK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase), une tyrosine kinase, phosphorylerait PKC θ sur sa tyrosine 90 en aval du TCR (Liu et al., 2000). Cette phosphorylation qui n'est pas retrouvée dans les autres PKCs régule positivement les effets de PKC θ sur les facteurs de transcription NF-AT et NF- κ B dans les cellules T (Liu et al., 2000). Elle pourrait aussi réguler la translocation à la membrane de PKC θ (Liu et al., 2000).

D'autres phosphorylations ont également été décrites telles que sur la thréonine 219 et les sérines 676 et 685. Cependant, les mécanismes induisant ces phosphorylations et leurs fonctions exactes sont mal connues (Wang et al., 2012 ; **figure 20**).

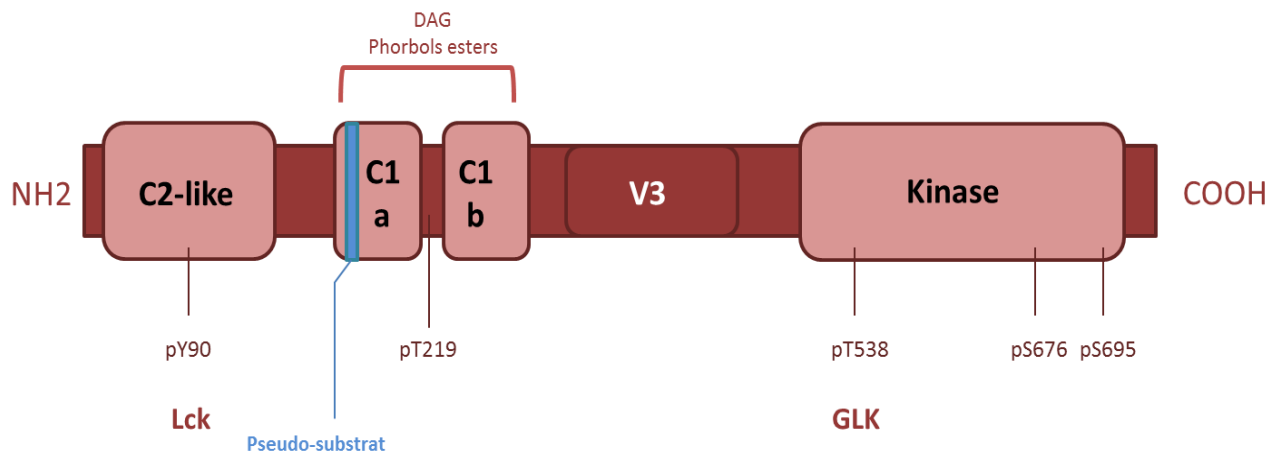


Figure 20. Structure et sites de phosphorylations de PKCθ.

4.3. Fonctions de PKCθ.

4.3.1. PKCθ dans le système immunitaire.

Les lymphocytes T expriment huit membres de la famille des PKCs : PKCα, β, ε, η, θ, ζ, et ι (Pfeifhofer-Obermair et al., 2012). Cependant, PKCθ se distingue en possédant des propriétés uniques dans la régulation des Lymphocytes T (**Figure 21**).

4.3.1.1. PKCθ et la synapse immunologique.

La synapse immunologique (SI) est une jonction cellule-cellule stable formée entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène. C'est un complexe multiprotéique formé suite à la reconnaissance de l'antigène par le récepteur des lymphocytes T comprenant 3 couches fonctionnelles: la couche des récepteurs (avec le TCR-CD3, CD4 ou CD8, LFA1...), la couche « signalisante » comprenant entre autres PKCθ et la couche du cytosquelette (avec l'actine filamenteuse, la taline, paxilline, vinculine, FAK, PYK2..) (Michalczyk et al., 2012, Dustin and Depoil, 2011). Il a été montré que, suite à la stimulation par l'antigène des lymphocytes T, PKCθ est transloquée à la synapse immunologique (SI, Monks et al., 1997). La translocation de PKCθ à la SI n'est pas entièrement comprise mais plusieurs hypothèses ont été proposées. Suite à la stimulation par le TCR, la PLC-γ est activée

et aboutit à une forte concentration en DAG à la SI ce qui autorise le recrutement de PKCs nouvelles et classiques (Zhang et al., 2013). Cependant, les travaux de Villalba et al. ont montré que l'inhibition des PLCs ne limite qu'en partie la translocation à la membrane et l'activation de PKC θ dans des lymphocytes T (Villalba et al., 2002). De plus, la forte concentration en DAG n'expliquerait pas la localisation unique de PKC θ (et non des autres PKCs) à la région centrale de la synapse le cSMAC (central supramolecular activation cluster). Il a été montré que cette localisation précise nécessite le domaine V3 de PKC θ qui permet son interaction avec la kinase LCK et ainsi indirectement avec le récepteur CD28 de la SI (Kong et al., 2011). Le recrutement de PKC θ au cSMAC pourrait également nécessiter le recrutement préalable à la SI (non spécifiquement au cSMAC) des PKC ϵ et η (Quann et al., 2011). Enfin, il a été proposé par le groupe d'Amnon Altman que la translocation de PKC θ à la SI dépendrait de la polymérisation de l'actine induite par Rac suite à l'activation de Vav, une GEF activée en aval du TCR (Villalba et al., 2002).

Les phosphorylations de PKC θ par GLK et LCK pourraient également être nécessaires à sa translocation et à son maintien à la SI (Pfeifhofer-Obermair et al., 2012).

4.3.1.2. Rôles de PKC θ dans l'activation des Lymphocytes T.

Différentes études sur lymphocytes en culture ont permis de montrer que PKC θ contrôle différents facteurs de transcription nécessaires à l'activation des lymphocytes T : NF- κ B, AP-1 et NFAT. Ces facteurs de transcriptions permettent notamment l'expression de l'IL-2 une interleukine induisant la prolifération des lymphocytes (Zhang et al., 2013). En aval de l'activation du TCR, PKC θ est capable de phosphoryler directement une protéine d'échafaudage CARMA 1 (CARD-containing MAGUK protein 1) permettant à cette dernière d'induire la translocation nucléaire et l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Matsumoto et al., 2005; Wang et al., 2002).

Concernant AP-1, le groupe de Amnon Altman montre que suite à stimulation du TCR, PKC θ interagit avec et phosphoryle directement SPAK, une MAP-kinase (mitogen-activated protein kinase). L'inhibition de SPAK empêche complètement les effets de PKC θ sur le facteur de transcription (Li et al., 2004).

Les effets positifs de PKC θ sur l'activation de NFAT sont moins compris (Zhang et al., 2012).

Au-delà de ses effets sur les facteurs de transcription, Sutcliffe et al. ont montré que PKC θ est capable dans des lymphocytes T d'interagir avec les promoteurs de gènes induits dans les réponses immunitaires. Les auteurs suggèrent qu'elle permettrait le recrutement de l'ADN polymérase II (Sutcliffe et al., 2011).

De plus, PKC θ agirait sur l'activation des Lymphocytes T en permettant leur polarisation nécessaire à la libération de cytokines et d'éléments cytolytiques en direction de la cellule présentatrice d'antigène. Cette polarisation est permise par la réorientation du centre organisateur des microtubules (MTOC) à proximité de la synapse immunologique (Michalczyk et al., 2012). Ainsi, Quann et al. montrent qu'une inhibition par ARNi (ARN interférents) de PKC θ limite fortement la réorientation du MTOC (Quann et al., 2011).

4.3.1.3. Rôles de PKC θ dans la différenciation des lymphocytes T : données *in vivo*.

Une fois activés, les lymphocytes T naïfs peuvent se différencier en acquérant des capacités effectrices particulières. Ainsi, les Lymphocytes T CD4⁺ peuvent se différencier en Th1, Th2 ou Th17 (**Figure 21**). Diverses utilisations de souris PKC θ ^{-/-}, qui sont, il faut le noter, en bonne santé et fertiles (Sun et al., 2000), ont permis d'étudier le rôle de PKC θ dans le système immunitaire *in vivo*. Ainsi, plusieurs études montrent que PKC θ est impliquée dans les réponses immunitaires Th2 et Th17, respectivement associées aux réactions allergiques et auto-immunes. L'association entre PKC θ via son domaine V3 à LCK est nécessaire à la différenciation des Lymphocytes T naïfs en Th2 et Th17 mais non Th1 (Kong et al., 2011). De façon étonnante, PKC θ n'est pas essentielle aux réponses immunitaires de défense face aux pathogènes (viraux ou bactériens) (Zhang et al., 2013). Cette importance restreinte de PKC θ dans le système immunitaire est apparue surprenante au vu des résultats obtenus sur les lignées cellulaires montrant son implication dans l'activation des Lymphocytes T (sous partie précédente). Les auteurs de la dernière grande revue sur PKC θ suggèrent que des mécanismes de compensation mis en place *in vivo* suite à des phénomènes d'infection pourraient expliquer ces résultats (Zhang et al., 2013). Cependant, l'implication sélective de PKC θ dans les réactions immunitaires délétères en association avec l'observation des souris PKC θ ^{-/-} fertiles et saines, ont aussi permis de considérer PKC θ en tant que cible

thérapeutique pour lutter contre des maladies auto-immunes ou inflammatoires (Hage-Sleiman et al., 2015).

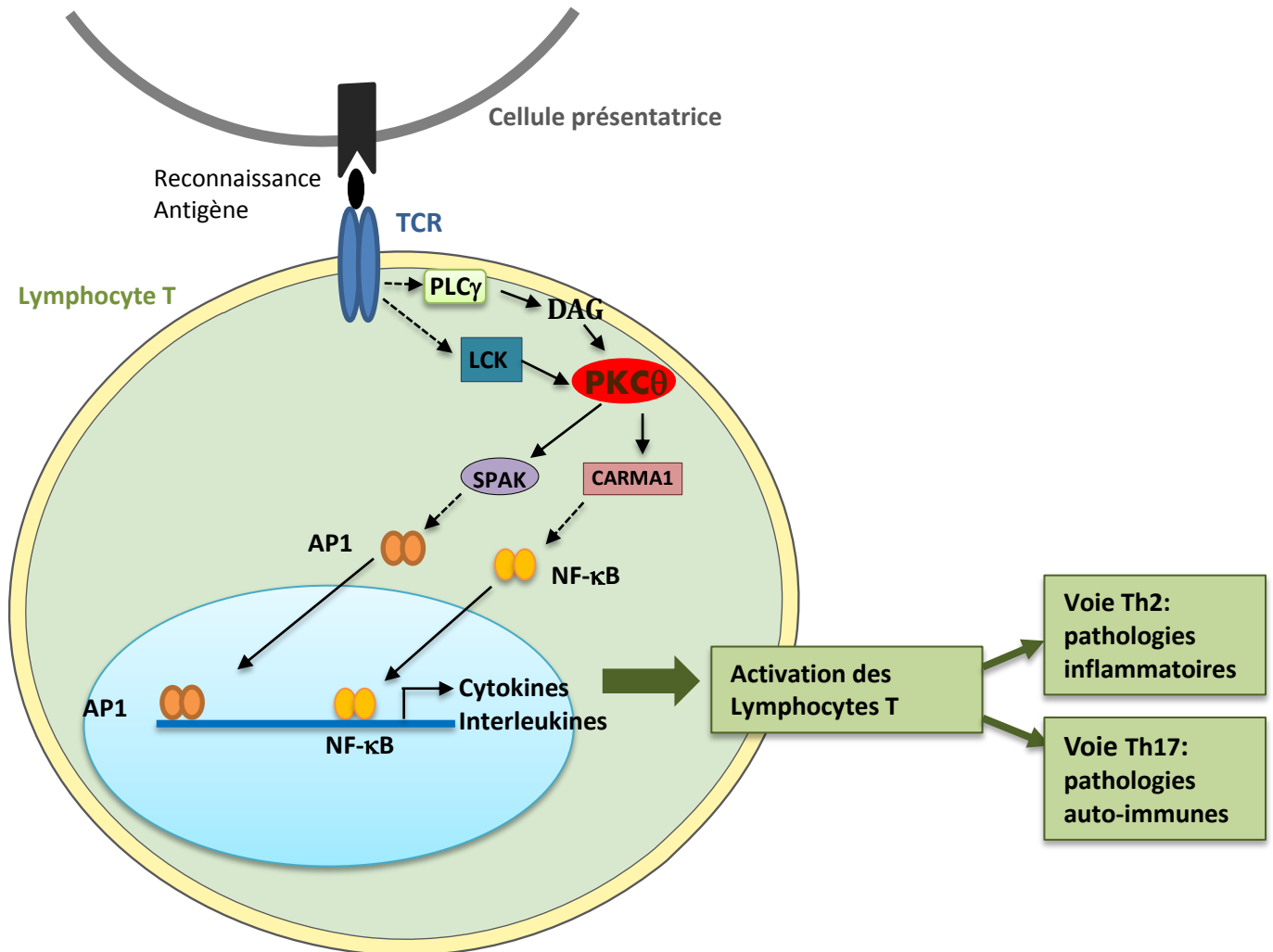


Figure 21. Fonction de PKCθ dans l'activation des lymphocytes T.

Suite à la reconnaissance de l'antigène, PKCθ est activée par le DAG et/ou par LCK qui la phosphoryle directement. PKCθ est alors capable de phosphoryler SPAK et CARMA1, événements qui permettent d'activer les facteurs de transcription AP1 et NF-κB et l'expression de leurs gènes cibles permettant la prolifération et la différenciation des lymphocytes principalement en Th17 et Th2 impliqués respectivement dans les maladies auto-immunes et inflammatoires.

4.3.2. PKC θ dans les muscles squelettiques

Les jeunes souris PKC θ ^{-/-} (4-5 semaines) présentent une masse musculaire réduite associée à une diminution de la taille des fibres musculaires (Madaro et al., 2011). Les auteurs de cette étude montrent *in vitro* sur des myoblastes murins en culture que l'inhibition de PKC θ affecte la fusion des myoblastes, étape nécessaire à la formation des fibres musculaires. Ils observent que l'inhibition de PKC θ empêche l'augmentation d'expression de l'intégrine β 1 et de la cavéoline-3, événement essentiel à la fusion des myoblastes. Ils proposent que l'effet positif de PKC θ sur l'expression de ces deux protéines passerait par une augmentation de l'activation de FAK reflétée par son niveau de phosphorylation sur Y397 (Madaro et al., 2011).

Toujours dans le développement musculaire, Messina et al. montrent que PKC θ forme avec le facteur de transcription Nfix2 un complexe régulant l'expression de gènes nécessaires à la myogenèse foetale murine (Messina et al., 2010).

Dans les muscles squelettiques de souris adulte, Kim et al. ont montré que PKC θ joue un rôle dans le développement de résistance à l'insuline induite par un régime gras dans le muscle squelettique (Kim et al., 2003). Li et al. ont exploré les mécanismes à l'origine de cette influence qui passerait par la phosphorylation par PKC θ de IRS1 (insulin receptor substrate protein 1), une protéine impliquée dans la signalisation à l'insuline (Li et al., 2004).

4.3.3. PKC θ et cancer

Contrairement à beaucoup de PKCs, les liens entre PKC θ et cancer ont été relativement peu étudiés. Toutefois, il est aujourd'hui établi que PKC θ est utile au diagnostic des tumeurs stromales digestives et plusieurs études suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle important dans l'oncogenèse mammaire.

4.3.3.1. Tumeurs stromales digestives.

Au milieu des années 2000, différentes études ont montré que PKC θ est surexprimée dans la majorité des tumeurs issues des tissus mésenchymateux du tube digestif, les tumeurs stromales digestives ou GIST (Gastro-intestinal Stromal Tumor). Ces observations ont été

faites à la fois au niveau ARNm par microarray à ADNc (Blay et al., 2004) que protéique par immunohistochimie (Motegi et al., 2005). L'oncogène KIT (CD117), fréquemment muté dans ces tumeurs, est normalement utilisé comme immuno-marqueur pour le diagnostic de ces tumeurs. Cependant, 4 à 5 % des GIST n'expriment pas KIT (Kang et al., 2011). Dans ces cas-là, il a été montré que PKC θ pouvait servir de marqueur de diagnostic pour ces GIST KIT-négatives (Kang et al., 2011). De façon intéressante, des western-blots réalisés à partir de tumeurs de patients ont montré que PKC θ est retrouvée sous sa forme activée, phosphorylée sur sa tyrosine 538 (Duensing et al., 2004). De plus, Ou et al. montrent sur des lignées de cellules GIST qu'une inhibition de PKC θ par ARNi abouti à une réduction de l'expression de KIT, de la signalisation PI3K/Akt à un arrêt du cycle en G1 et à de l'apoptose (Ou et al., 2008).

4.3.3.2. Cancers du sein.

En 2007, l'équipe constate par western blot que PKC θ est fortement exprimée dans des lignées de cancers du sein n'exprimant pas le récepteur aux estrogènes RE α (RE-), également triple-négatives (lignées MDA-MB-231, Hs-578T, BT549) alors qu'elle ne l'est pas dans des cellules de lignées de cancer du sein RE positives (lignées MCF7, T47D, ZR75, BT474) (Belguise and Sonenshein, 2007 ; **figure 22**). De plus, ils observent au niveau ARNm que les tumeurs de patientes RE- expriment plus fortement PKC θ que les tumeurs RE+ (Belguise and Sonenshein, 2007). Cette expression de PKC θ dans les tumeurs du sein RE- a été confirmée par immunohistochimie sur tumeurs de patientes par Soyombo et al. qui observent que la majorité des tumeurs RE+/PR+ expriment faiblement PKC θ alors que les tumeurs ER-/PR- présentent en majorité un niveau d'expression de PKC θ fort (Soyombo et al., 2013). Ils observent également que PKC θ n'est que très faiblement exprimée dans les tissus mammaires normaux. Récemment, Byerly et al. ont publié que le niveau d'ARNm de PKC θ est plus haut dans des tumeurs du sein triples négatives que dans des tumeurs RE positives (Byerly et al., 2016).

Constatant cette surexpression, l'équipe a étudié le rôle que pouvait jouer PKC θ dans l'oncogenèse des cellules mammaires. Ils constatent que l'expression d'une PKC θ « kinase dead » dominant négatif inhibe fortement la prolifération de lignées de cellules de cancer du sein murines surexprimant c-rel, un facteur de transcription aux fonctions oncogéniques

(Figure 22). De plus, la surexpression d'une PKC θ constitutivement active dans des lignées RE+ humaines n'exprimant pas ou très peu PKC θ de façon basale aboutit à une augmentation des capacités migratoires de ces cellules. Les effets de PKC θ sur la prolifération et la migration ont été confirmés par une autre équipe qui montre que la surexpression de PKC θ dans une lignée de cellules mammaires non transformées (MCF10A) aboutit à une augmentation des capacités prolifératives et migratoires de ces cellules (Byerly et al., 2016).

Notre équipe s'est intéressée aux mécanismes moléculaires à l'origine de ces effets. Ils montrent que les effets de PKC θ passent par un contrôle du facteur de transcription c-Rel : l'activation de PKC θ induit l'activation de la serine thréonine kinase Akt (PKB) qui provoque l'exportation nucléaire de FOXO3 limitant l'expression des gènes contrôlés par ce facteur de transcription dont celui du RE α et p27. Ainsi, PKC θ limite l'expression du RE α , récepteur qui inhibe l'activité de c-Rel. Aussi, indirectement, l'activation de PKC θ aboutit à une augmentation de l'expression des gènes cibles de c-Rel soit l'oncogène c-MYC, la cycline D1, RELB et BCL-XL pouvant ainsi expliquer les effets de PKC θ sur la prolifération cellulaire (Belguise and Sonenshein, 2007). En 2012, l'équipe a exploré les effets de PKC θ sur la migration cellulaire et a ainsi constaté que PKC θ contrôle indirectement la migration de cellules du cancer du sein via Fra1, un autre facteur de transcription (Belguise et al., 2012). Ce contrôle s'établit via un effet positif de PKC θ sur SPAK (Ste20-related proline-alanine-rich kinase) et ERK1/2. Dans cet article, l'équipe montre également que la surexpression d'une PKC θ constitutivement active dans des MCF7 (RE+) aboutit également à une augmentation des capacités invasives de ces cellules mesurées par l'invasion d'une couche de matrigel dans des chambres de Boyden (Belguise et al., 2012). Ils montrent aussi que Fra-1 est partiellement responsable des effets positifs de PKC θ sur l'invasion des cellules mammaires, les mécanismes exacts de ce contrôle restant inexplorés (Belguise et al., 2012; **figure 22**).

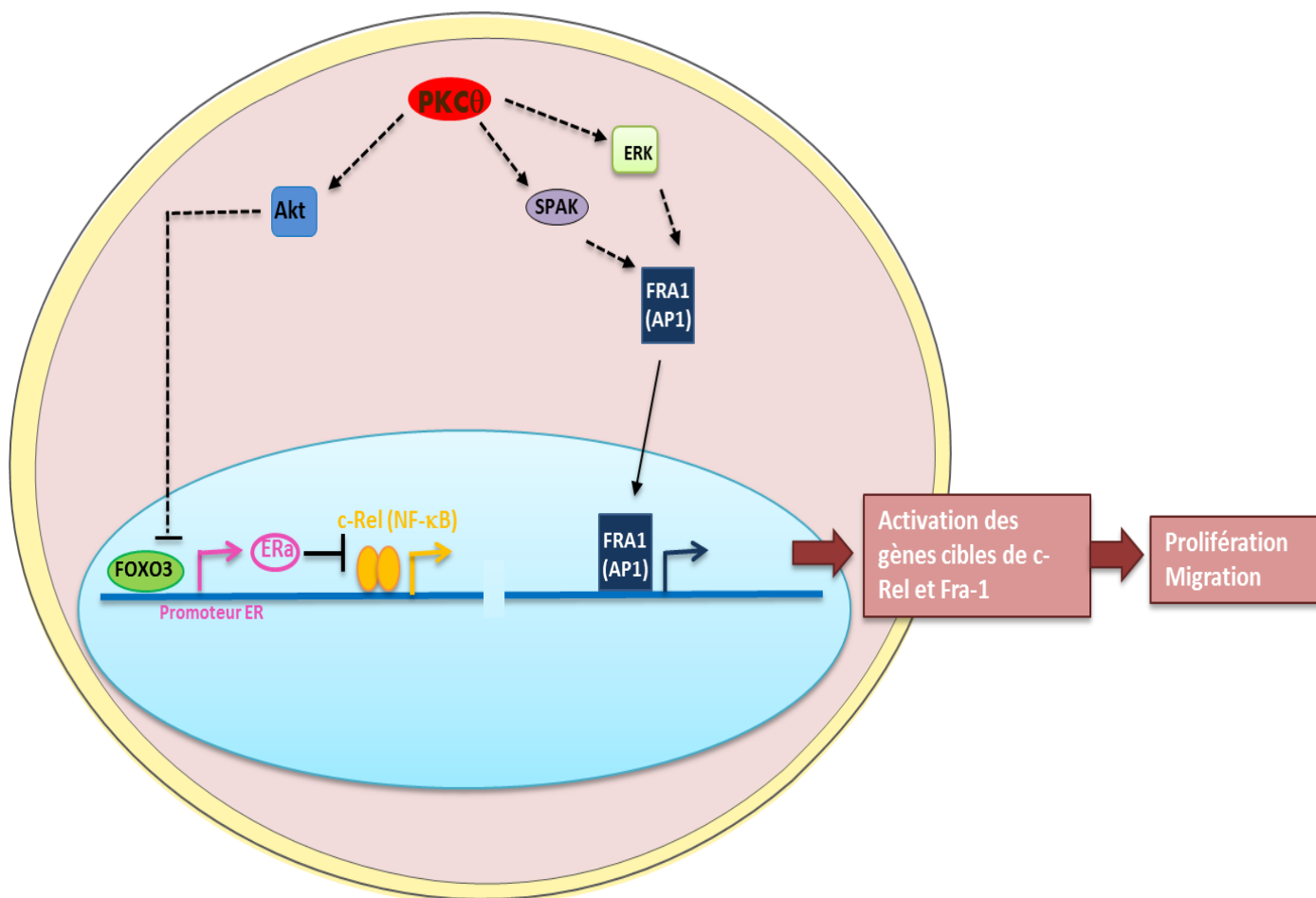


Figure 22. Fonction de PKCθ dans les cellules de cancer du sein.

PKCθ est capable de contrôler la prolifération et la migration des cellules de cancer du sein par deux voies différentes. **1:** PKCθ contrôle positivement l'activation de Akt qui inhibe Foxo3, limitant ainsi l'expression du REα. Le REα inhibant c-Rel, PKCθ aboutit à la transcription des gènes cibles de c-Rel (Belguise et al., 2007). **2:** PKCθ contrôle positivement SPK et Erk qui permettent l'activation de Fra-1 et l'expression de ses gènes cibles (Belguise et al., 2012).

OBJECTIFS GENERAUX DE LA THESE.

Ces trente dernières années, le développement de thérapies hormonales et des thérapies ciblées dirigées contre le récepteur HER2 ont considérablement amélioré les pronostics associés au cancer du sein. Cependant, les cancers du sein triple-négatifs ne répondent par définition pas à ces deux thérapies et restent ainsi en marge de ces progrès. Or, ce sous type de cancer du sein ne représente pas moins de 17% des cancers du sein diagnostiqués, affecte des femmes jeunes et est caractérisé par un risque de dissémination métastatique et de récives accrus, malgré l'utilisation de chimiothérapies cytotoxiques. Aussi, une meilleure compréhension de la biologie de ces CSTN constitue un enjeu majeur de la recherche en cancérologie. En effet, une meilleure connaissance des mécanismes de tumorigénèse de ces cancers pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que l'équipe identifie en 2012 une cible thérapeutique potentielle : la PKC θ . Ils montrent que cette protéine est fortement exprimée dans des lignées de cellules CSTN alors qu'elle ne l'est pas dans des lignées de cancer du sein exprimant le récepteur aux estrogènes. De plus, ils observent que sa surexpression augmente considérablement les capacités invasives de ces cellules *in vitro* (Belguise et al., 2012).

L'objectif de ma thèse était de faire suite à cet article en essayant de comprendre l'implication de PKC θ dans le contrôle de l'invasion des cellules de cancer du sein triple-négatifs. Il s'agissait de démontrer l'implication de PKC θ dans le contrôle de l'invasion des CSTN, mais aussi de comprendre par quels mécanismes moléculaires cette kinase est capable de contrôler la dissémination de ces cellules tumorales.

Ainsi de façon plus large, ma thèse avait pour objectif d'apporter une meilleure compréhension de la biologie des CSTN, tout en explorant les fonctions moléculaires de la PKC θ , jusqu'ici très peu explorées. Enfin, nous espérons de cette façon permettre de mieux définir la PKC θ en tant que nouvelle cible thérapeutique contre les CSTN.

RESULTATS.

Chapitre V

Étude de l'implication de FAK dans le contrôle de l'invasion par PKC θ .

5.1 . Contexte de l'étude et principaux résultats.

Dans l'article publié en 2012, l'équipe montre qu'une surexpression d'une PKC θ constitutivement active dans des MCF7 (lignées de cancer du sein RE+ n'exprimant normalement pas PKC θ) augmente fortement la capacité de ces cellules à traverser une couche de matrigel dans un essai d'invasion *in vitro*, sans élucider les mécanismes de ce contrôle (Belguise et al., 2012).

Ces résultats, combinés à l'observation d'une expression spécifique de PKC θ dans des cellules de cancer du sein triple-négatif caractérisé par leur grande agressivité, nous ont poussés à poursuivre l'exploration du rôle joué par PKC θ dans l'invasion de ces cancers.

Ainsi, dans un premier temps nous avons caractérisé l'invasion induite par PKC θ (**Figure 1**). Nous observons, par l'utilisation d'ARNi ou sh-RNA (small hairpin RNA), que PKC θ contrôle positivement l'invasion de lignées de CSTN *in vitro* et influence la formation de métastases par ces cellules *in vivo*.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré en détail les mécanismes moléculaires par lesquels PKC θ contrôle l'invasion. Nous observons que PKC θ contrôle l'activation de FAK (**Figure 2**) à la fois en permettant son ouverture (**Figure 5**) mais aussi en la phosphorylant directement sur des sites nouvellement identifiés, les sérines 892-893. Ces phosphorylations sont en grande partie responsables des effets de PKC θ sur l'invasion *in vitro* (**Figures 6 et 7**).

En aval de cette activation de FAK, nous montrons notamment grâce à l'utilisation d'une PKC θ activable que PKC θ attribue aux cellules un phénotype pouvant être qualifié de migratoire: les cellules présentent une augmentation de la dynamique de formation/rétraction de protrusions mais aussi de celle de l'assemblage/désassemblage des adhérences à la matrice (**Figures 3 et 4**). Nous montrons que les phosphorylations sur

sérines 892-893 sont impliquées dans ce contrôle des adhérences et des protrusions. Ainsi, il n'est pas étonnant de constater que PKC θ et FAK phosphorylée sur ses sérines 892-893 se localisent au front de cellules en migration, zone où se forment les protrusions et les adhérences naissantes (**Figure 7**).

Pour conclure, cette étude permet à la fois de mieux définir PKC θ en tant que cible thérapeutique potentielle pour les CSTN mais lui attribue aussi un nouveau rôle de contrôle direct de la migration et de l'invasion cellulaire, tout en mettant en lumière un mécanisme inédit d'activation de la protéine FAK.

5.6 Article.

PKC θ phosphorylates FAK to promote cancer cell invasion through nascent focal adhesion and protrusion dynamics

Lucie Chadelle¹, Valérie Cadamuro¹, Jiaying Liu¹, Sarah Gandarillas², Carine Froment³, Florence Capilla⁴, Christele Segura⁵, Loic Van Den Berrghe⁵, Talal Al Saatti⁴, Odile Schiltz³, Yara Barreira², Dany Chalbos⁶, Georges Czaplicki³, Klaus Hahn⁷, Xiaobo Wang^{1a}, Karine Belguise^{1a}

¹ LBCMCP, Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31062 Toulouse, France.

² Service d'Expérimentation Animale, UMS 006/CREFRE Inserm/UPS, 31059, Toulouse, France.

³ Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale-CNRS, Université de Toulouse, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France.

⁴ Service d'Histopathologie, INSERM/UPS-Unité de service 006/Centre Régional d'Exploration fonctionnelle et Ressources Expérimentales, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, 31300 Toulouse, France.

⁵ Inserm UMR1037, CRCT (Cancer Research Center of Toulouse), F-31037, Toulouse, France.

⁶ IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France.

⁷ Department of Pharmacology and Lineberger Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

^a Correspondence should be addressed to K.B (email: karine.belguise@univ-tlse3.fr) and X.W. (email: xiaobo.wang@univ-tlse3.fr)

ABSTRACT

The understanding of the signaling events responsible for the high metastatic potential of triple negative breast cancers (TNBC) is critical to identify more effective and less toxic therapeutic strategies. Here, we find that the active serine/threonine kinase PKC θ , which is strongly expressed in TNBC cells and patients samples, is required to maintain *in vitro* and *in vivo* the strong invasive activity of TNBC cells. Notably, PKC θ -driven invasion is mediated by the activation of FAK signaling. We show that PKC θ prominently controls the dynamic of focal adhesion formation through the activation of FAK signaling. PKC θ also regulates the dynamics of Rho GTPases activity, thus leading to the formation of active protrusions that are required to induce cell invasion. Using a rapamycin-activatable system, we confirm that the rapid allosteric activation of PKC θ is sufficient to induce focal adhesion and protrusion dynamics. Mechanistically, we highlighted that PKC θ directly interacts with the FAK FERM domain resulting in FAK opened conformation. Interestingly, PKC θ phosphorylates FAK at newly identified residues that are implicated in FAK activation. Importantly, this phosphorylated FAK, exclusively located at nascent focal adhesions with active PKC θ , is necessary for the PKC θ -induced invasion and adhesion dynamic. Thus, our findings reveal a new mechanism of FAK activation strengthening the emerging oncogenic function of PKC θ and suggest that PKC θ /phosphoFAK axis could serve as a potential marker for TNBC diagnosis and therapy.

INTRODUCTION

Triple-negative breast cancer (TNBC), which lacks estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression as well as human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) amplification, constitutes 10%–20% of all breast cancers. TNBC exhibits aggressive characteristics such as poor differentiation, a higher rate of proliferation, and increased metastatic capability. Currently, no clinically relevant biomarkers can be used to guide the use of targeted therapies for TNBC and the only treatment available is the toxic, non-specific chemotherapy drugs. Consequently, there is an urgent need to identify more effective, less toxic therapeutic strategies, and thus further investigations of the biology of TNBC are required to identify the signaling pathways that drive the strong metastatic ability of TNBC.

Lately, we identified the serine/threonine kinase PKC θ as a potential new biomarker of TNBC. PKC θ , which is a member of the novel family of PKC proteins, plays a central role in immune responses since it is a key enzyme in T lymphocyte activation. However, little is known about its function in cancer. Our work has been the first one to show that PKC θ also plays a function in the control of the cellular biological processes related to the breast cancer field. Indeed, PKC θ is strongly expressed in TNBC and it plays a critical role in the control of migration and invasion of breast cancer cells. Moreover, PKC θ is an attractive therapeutic target for TNBC since its expression is restricted to a few normal cell types (T lymphocytes, platelets and skeletal muscle cells) while it is highly expressed in TNBC and thus the use of highly specific PKC θ inhibitor as targeted therapy might lead to minimal toxicities in TNBC patients. However, the molecular events underlying PKC θ -induced invasion have not been clearly elucidated and therefore the identification of this mechanism is critical to improve our understanding of the signaling events responsible for the high metastatic potential of TNBC.

Tumor cell invasion into the surrounding microenvironment is critical to the metastatic spreading of cancer cells. The change in the dynamic of cytoskeleton and focal adhesion (FA), which mediate the interaction between the cancer cell and the extracellular matrix (ECM), is one of the key steps required for tumor cell invasion. The control of both signal dynamics is mainly dependent on the activation of the Focal Adhesion Kinase (FAK) signaling, which either directly controls the assembly and disassembly cycle of FA or indirectly regulates cytoskeletal events via the Rho small GTPases. FAK is a cytoplasmic protein tyrosine kinase that is highly expressed or activated in many human advanced cancers including breast cancer, and it has been known to promote tumor progression and metastasis. FAK responds to diverse extracellular stimuli, including signals from the ECM. Indeed, upon integrin–ECM engagement and integrin clustering, FAK is activated and recruited to nascent FA. At the same time, others signaling scaffolding proteins such as paxillin, RACK1, and talin are also rapidly recruited to nascent adhesions. Although the protein composition within FA is well detailed, the sequence of events that leads to assembly of the adhesion protein complexes remains under investigation. Elucidating the regulatory mechanisms of FAK activation is crucial for understanding the biological function of FAK in cancer. Mechanistically, FAK activation is not understood and several hypotheses have been provided among which one mechanism is based on the auto-inhibitory function of the FAK FERM domain that plays a prominent role in the intramolecular regulation of FAK activity. Indeed, the FERM domain of FAK interacts with its kinase domain to block the FAK kinase activity. More precisely, the F2 FERM domain (126-253) is important for the physical interaction between the FERM and kinase domain. One proposed model is that a FERM binding partner interacts with the F2 FERM domain of FAK, and this interaction might prevent the binding of the FERM motif to its kinase domain, thus releasing the autophosphorylation of FAK at Y397 and then recruiting Src to FAK for its complete activation by phosphorylation on Y576/Y577.

However, the FERM binding partners that release FAK kinase domain and hence trigger FAK activation are still under investigation.

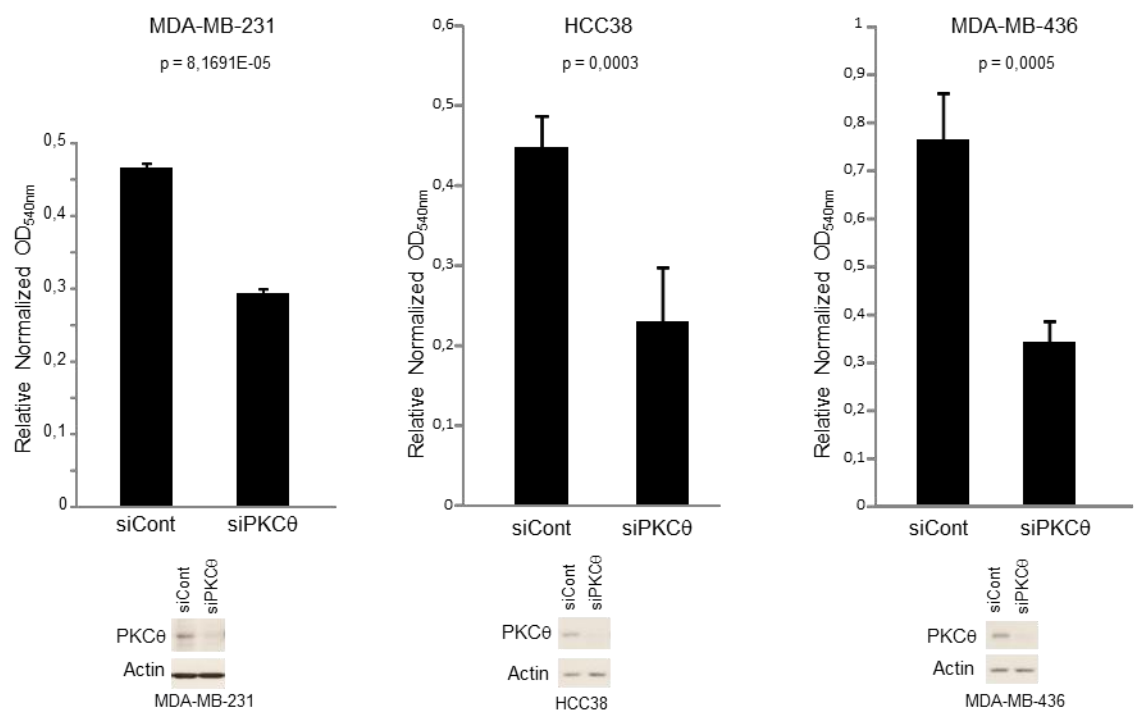
In this study, we found that PKC θ inhibition significantly decreases cell invasion and metastasis of TNBC cells. PKC θ promotes cell invasion by activating FAK signaling, and thus PKC θ enhanced the dynamic of FA turnover, the dynamic of small GTPases activity and protrusions formation. We have also deciphered the molecular mechanism by which PKC θ controlled FAK signaling. The regulatory domain of PKC θ interacted directly with the FERM domain (N-terminal domain) of FAK thus leading to its opening conformation and activation. Interestingly, PKC θ phosphorylated FAK and several phosphorylation sites located in the kinase domain and C-terminal domain of FAK were identified using mass spectrometry. Among these sites, the PKC θ phosphorylation of residues located in the C-terminal part of FAK were important for the activation of FAK. Moreover, using a non phosphorylatable mutant of FAK, we showed that these phosphorylation sites mediated the effects of PKC θ on FA and membrane dynamic, and thus on the invasive ability of breast cancer cells.

RESULTS

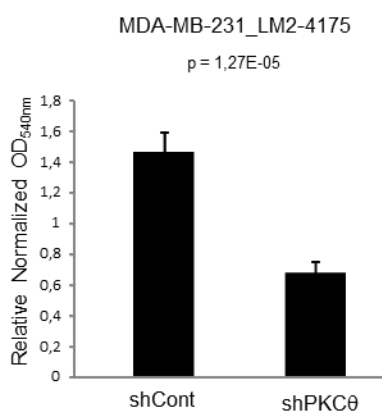
PKC θ is required to maintain the high invasive phenotype of TNBC cells

Previously, we have shown that the expression of active PKC θ was sufficient to increase the invasive ability of low invasive breast cancer cells that do not express endogenous level of PKC θ (belguise 2012). To confirm that PKC θ is required to maintain a high invasive phenotype, we inhibited PKC θ by siRNA in TNBC cells (MDA-MB-231, MDA-MB-436, and HCC38) that express high endogenous level of PKC θ . We found that PKC θ inhibition led to a significant reduction of invasive ability of several TNBC cell lines as measured by an *in vitro* invasion assay (Figure 1a). In order to determine the *in vivo* relevance of the implication of PKC θ in the invasion of TNBC cells, we used experimental metastasis mouse model. The very highly invasive luciferase-labelled MDA 231-LM2-4175 cells (Nature. 2005. 436:518-24) were injected into the tail vein of immunodeficient mice and we assayed the effect of PKC θ knockdown by shRNA, validated *in vitro* (Figure 1b), on the colonization of tumor cells in the lung by using bioluminescence imaging as well as gross examination of the lungs at necropsy (Figure 1c). We observed that PKC θ inhibition caused a 60% reduction in the number of mice exhibiting lung metastases (Figure 1d). The decrease in PKC θ levels significantly reduced the strong lung metastatic activity of MDA 231-LM2-4175 cells as shown by the photon flux measurements (Figure 1e). The histological analyses of lung tissues using hematoxylin and eosin staining confirmed that lung tissues from shPKC θ group were nearly normal while the ones from shCont group were heavily infiltrated (Figure 1f). All these findings clearly demonstrated that PKC θ was necessary to maintain *in vitro* and *in vivo* the strong invasive activity of TNBC cells.

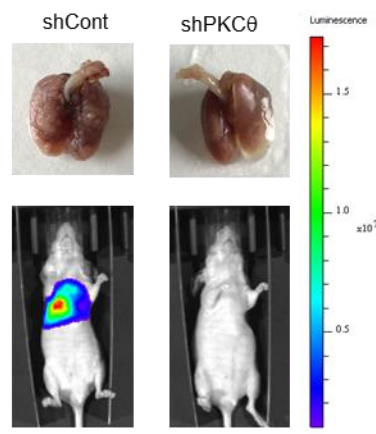
a



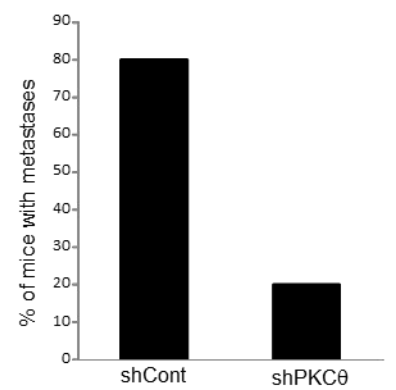
b



c



d



e

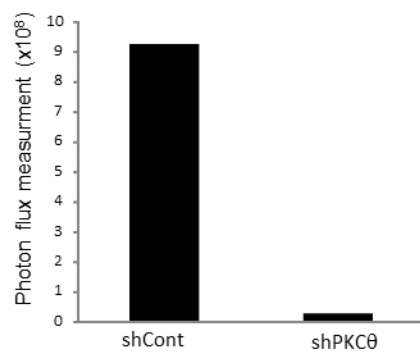


Figure 1

Figure 1. The loss of PKC θ reduces *in vitro* and *in vivo* the strong invasive activity of TNBC cells. *a.* TNBC cells (MDA-MB-231, HCC38, MDA-MB-436) were transfected with two different siRNAs (3.6 nM each) targeting the PRKCQ gene and after two successive 48h-transfections, cells were either plated in 12-well plates for immunoblotting analysis (**bottom panel**) or subjected, in triplicate, to an invasion assay (**top panel**) for 16 h. Cells that invaded to the lower side of the filter were quantified using spectrometric determination of the optical density at 540 nm and normalized by the OD540 obtained with the control cells as described in Materials and Methods. The values represent the mean (\pm SD) of three independent experiments performed in triplicate. The p-values were calculated using the paired Student's t-test (two-tailed). *b.* MDA-MB-231-LM2-4175 cells stably expressing control shRNA or PRKCQ shRNA were subjected, in triplicate, to an invasion assay for 16 h as described in A. *c.* Representative lungs harvested at necropsy and bioluminescent imaging of the indicated cell lines are shown after tail-vein injection. *d.* The graph represents the percentage of animals that developed lung metastases following tail vein injections. *e.* Quantification of metastases burden on mice was estimated by photon flux measurement.

PKC θ -driven invasion is mediated by FAK signaling

The next question was to determine how PKC θ controlled the invasive ability of TNBC cells. Acquisition of invasive phenotype involves activation of signaling pathways controlling the turnover of cell–matrix adhesions and cytoskeletal dynamics (Ref). Therefore, a plausible candidate that could mediate the PKC θ effect was the FAK signaling (Ref). First, we checked the global activation level of FAK signaling in TNBC cells compared to low invasive breast cancer cells by visualizing the level of FAK phosphorylations (Y397, Y576/577, and Y925) as well as the phosphorylation level of FAK downstream targets, Src (Y416) and Paxillin (Y118). The western blot analysis showed that FAK activation was globally stronger in TNBC cells than in low invasive breast cancer cells (Figure 2a). More importantly, the expression of active PKC θ in low invasive breast cancer cells (MCF7 and ZR75-1) strongly stimulated the activation of FAK signaling (Figure 2b and d) while its inhibition by siRNA in

TNBC cells (BT549 and MDA-MB-436) caused a prominent decrease in active FAK signaling (Figure 2c and e) as visualized by western blot and immunofluorescence. Very interestingly, the inhibition of other PKC family members, which are also involved in TNBC cells aggressiveness (PKC α , PKC ϵ) or closely related to PKC θ (PKC δ) (Ref), didn't affect the FAK signaling in TNBC cells (Suppl. Figure 1a) suggesting that FAK signaling was controlled by a specific PKC family member, that is PKC θ , in TNBC cells. To determine whether the PKC θ effect on invasion was due to the activation of FAK signaling, we repressed FAK expression by using two different siRNAs in low invasive breast cancer cells (MCF7 and ZR75-1) expressing active PKC θ . The PKC θ -induced invasion was completely blocked after FAK inhibition (Figure 2f, g and Suppl. Figure 1b) as well as after paxillin repression (Suppl. Figure 1c).

Altogether these data showed that PKC θ controlled the invasive ability of TNBC cells through the activation of FAK signaling.

PKC θ induces nascent focal adhesion and protrusion dynamic

Since FAK activation is known to induce nascent FA (Ref), we next addressed whether active PKC θ could lead to the formation of new FA. Therefore, the low invasive breast cancer cells MCF7 expressing active PKC θ under the Tet-Off system were transfected with GFP-paxillin expression vector to label the FA. Cells were plated on fibronectin and imaged with spinning disc for 2 hours. We then quantified FA dynamics as described in Suppl. Figure 2a. This analysis showed that active PKC θ induced the formation of nascent FA and led to very dynamic FA turnover (Figure 3 a, b, c and Supplementary Movie 1). We also quantified protrusion dynamics as described in Suppl. Figure 2a. We observed that active PKC θ strongly stimulated the formation of dynamic protrusions (Figure 3 d, e, f and Supplementary Movie 2). Very importantly, the dynamics of both FA (Figure 3 g, h, i and Supplementary Movie 3) and protrusions (Figure 3 j, k, l) were completely blocked upon FAK repression by siRNA.

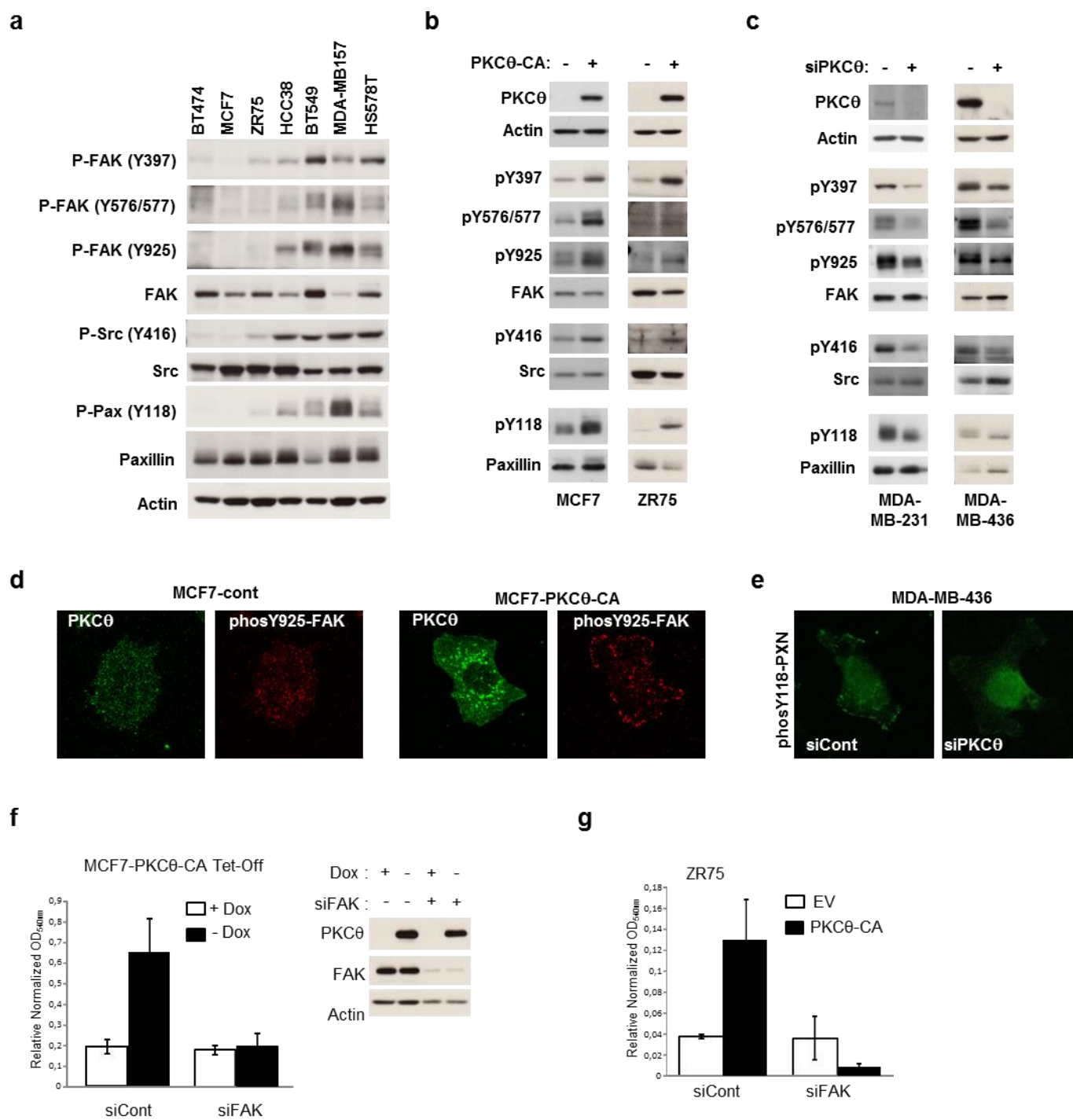


Figure 2

Figure 2. PKC θ controls the invasive ability of TNBC cells through the activation of FAK signaling. *a.* Whole-cell extracts (WCEs) from the indicated breast cancer cell lines were analyzed using immunoblotting with antibodies against FAK, pY397-FAK, pY576/577-FAK, pY925-FAK, Src, pY416-Src, Paxillin, pY118-Paxillin, and actin, which was used to confirm equal loading. *b.* MCF7 cells stably expressing active PKC θ (PKC θ -CA) under tetracycline control (MCF7-PKC θ -CA Tet-Off) were treated with or without Doxycycline (Dox), and ZR-75.1 cells were transiently transfected with 2 μ g of PKC θ -CA expression vector (+) or empty vector (-). Two days later, WCEs were subjected to immunoblotting analysis as in A. *c.* The indicated TNBC cell lines were transfected with two different siRNAs (3.6 nM each) targeting the PRKCQ gene. After two successive 48h-transfections, WCEs were subjected to immunoblotting analysis as in a. *d.* MCF7 cells stably expressing active PKC θ (PKC θ -CA) under tetracycline control (MCF7-PKC θ -CA Tet-Off) were treated with doxycycline for 48 h (MCF7-cont: +Dox; MCF7- PKC θ -CA: -Dox) and then were fixed and stained with the PKC θ and pY925-FAK antibodies *e.* MDA-MB-436 cells growing at medium confluence were fixed and stained with the pY118-Paxillin antibodies *f.* MCF7 cells stably expressing active PKC θ (PKC θ -CA) under tetracycline control (MCF7-PKC θ -CA Tet-Off) were transfected with 3.6 nM of siRNA targeting the FAK gene in the presence (+) or absence (-) of doxycycline (Dox). Two days later, cells were either plated in 12-well plates for immunoblotting analysis or subjected, in triplicate, to an invasion assay for 48 h as described in Figure 1a. *g.* ZR-75.1 cells were transfected with 3.6 nM of siRNA targeting the FAK gene. One day later, cells were co-transfected with pCDNA3.1Luc and PKC θ -CA expression vector (+) or empty vector (-) and 24h later, ZR-75.1 cells were either plated in 12-well plates for immunoblotting analysis or subjected, in triplicate, to an invasion assay for 48 h. Cells that invaded to the lower side of the filter were quantified using the determination of the luciferase activity as described in Materials and Methods. The values represent the mean (\pm SD) of three independent experiments performed in triplicate. The p-values were calculated using the paired Student's t-test (two-tailed).

Taken together, these data demonstrated the implication of PKC θ in the control of FA and protrusion dynamics via the activation of FAK signaling.

The activation of Rho GTPases has been reported to participate in the regulation of the protrusion dynamics (Ref). Consequently, we investigated the potential impact of PKC θ on Rho GTPases activation. First, we checked the global activity of the 3 Rho GTPases (Rac1, RhoA, and CDC42) by using FRET biosensors that were transfected in the MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells. The global activity of the 3 Rho GTPases was not affected by the activation of PKC θ . However, we were interested in the dynamic of Rho GTPases activity as described in Suppl. Figure 2b. We surprisingly found that active PKC θ caused robust dynamic changes for RhoA activity and more moderate dynamic changes for Rac1 and CDC42 activity (Figure 3m and Suppl. Figure 3a). Consistently, the PKC θ -induced invasion was completely abolished after RhoA inhibition by siRNA while Rac or CDC42 repression partly blocked this induction (Suppl. Figure 3b). Once again, the PKC θ effects on Rho GTPases dynamics were, in part, due to the activation of FAK signaling since the inhibition of FAK by siRNA diminished the dynamic changes induced by active PKC θ (Figure 3n). Based on these results, we concluded that PKC θ controlled the Rho GTPases dynamics, thus leading to the formation of active protrusions that are required to induce cell invasion.

FA and protrusion dynamics are confirmed by rapid allosteric activation of PKC θ

To rapidly and allosterically regulate PKC θ catalytic activity, we inserted iFKBP into the catalytic domain of PKC θ as previously described for FAK (Nat Biotechnol. 2010 Jul;28(7):743-7) (Figure 4a) . Among the 4 designed constructs (Suppl. Figure 4a) of PKC θ -iFKBP, we chose to perform all following experiments with the construct #3. The catalytic activity of PKC θ was induced upon addition of rapamycin and co-expression of FRB protein in MCF7 cells (Figure 4a). In the absence of reliable PKC θ substrate, we chose to monitor the kinase activity of PKC θ by following the activation of FAK and the induction of cell invasion by activated PKC θ . As shown in Figure 4b, one hour treatment with rapamycin was able to activate FAK in the presence of active PKC θ -iFKBP while this treatment has no effect in the

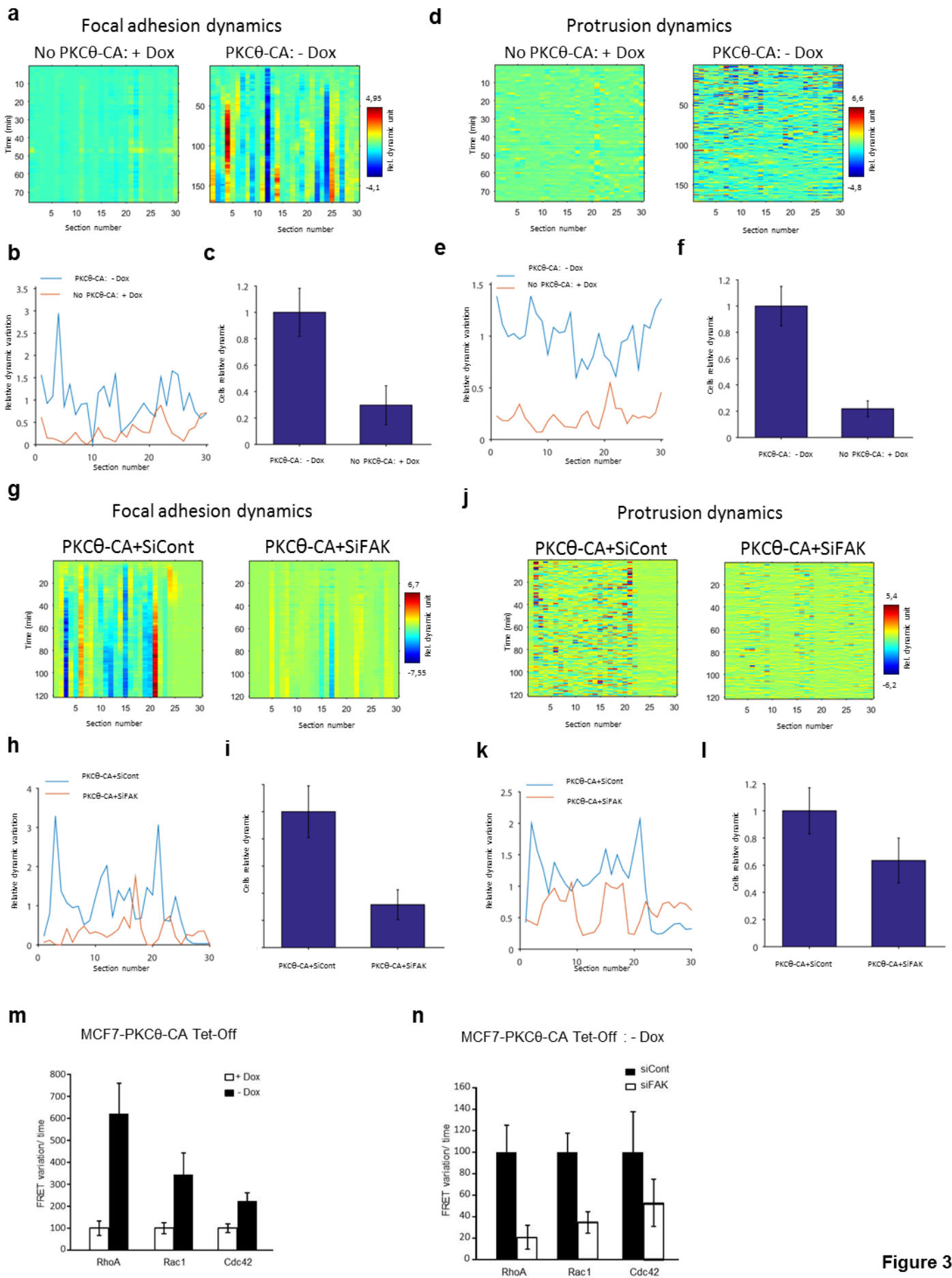


Figure 3

Figure 3. PKC θ controls FA and protrusion dynamics via the activation of FAK signaling and the dynamic of Rho GTPases activity. **a, g.** Heatmap from the indicated time periods of one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin: **(a)** MCF7-cont: +Dox and MCF7- PKC θ -CA: -Dox or **(g)** MCF7- PKC θ -CA expressing siCont or siFAK-5'UTR, in order to show the status of focal adhesion dynamics. Each row represents a series of the relative focal adhesion area from one section of MCF7 cell at the indicated time periods. Positions from 1 to 30 plotted on the x-axis correspond to the section. **b, h.** Quantification of relative focal adhesion dynamic variation in one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin : **(b)** MCF7-cont: +Dox and MCF7- PKC θ -CA: -Dox or **(h)** MCF7- PKC θ -CA expressing siCont or siFAK-5'UTR, as shown in **a** and **g**, plotted as a function of section number. **d, j.** Heatmap from the indicated time periods of one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin: **(d)** MCF7-cont: +Dox and MCF7- PKC θ -CA: -Dox or **(j)** MCF7- PKC θ -CA expressing siCont or siFAK-5'UTR, in order to show the status of protrusion dynamics. Each row represents a series of the relative protrusion area from one section of MCF7 cell at the indicated time periods. Positions from 1 to 30 plotted on the x-axis correspond to the section. **e, k.** Quantification of relative protrusion dynamic variation in one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin: **(e)** MCF7-cont: +Dox and MCF7- PKC θ -CA: -Dox or **(k)** MCF7- PKC θ -CA expressing siCont or siFAK-5'UTR, as shown in **d** and **j**, plotted as a function of section number. For all heatmap images, RGB color bars have been used to label the range of the signal dynamics of either focal adhesion area or protrusion area. **c, f.** Quantification of the relative percentage of the focal adhesion dynamic variation from the indicated MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells. **i, l.** Quantification of the relative percentage of the protrusion dynamic variation from the indicated MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells. **n** is the number of samples analysed (more than 5 in **c, f, i, l**). All error bars indicate \pm s.d., $P < 0.001$ means significant difference by student's t-test. **m, n.** Quantification of the relative FRET dynamic variation from different smallGTPases biosensors (RhoA, Rac1, cdc42) that have been expressed in the indicated MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell: **(m)** MCF7-cont: +Dox and MCF7- PKC θ -CA: -Dox or **(n)** MCF7- PKC θ -CA expressing siCont or siFAK-5'UTR. The number of the analyzed cells at each condition is 12

presence of the kinase dead form of PKC θ -iFKBP (PKC θ -iFKBP-KD). According to these results, rapamycin treatment induced the invasive ability of MCF7 cells in the presence of

active PKC θ -iFKBP but not with PKC θ -iFKBP-KD (Figure 4c). Moreover, immunofluorescence analysis of fixed and living MCF7 cells indicated that the activation of PKC θ -iFKBP was accompanied by rapid translocation of cherry-FRB and FAK to active protrusions and co-localization with GFP-PKC θ -iFKBP (Figure 4d and Suppl. Figure 4b and c) further confirming the rapid allosteric activation of PKC θ . Next, we used this rapamycin-activatable system to follow the dynamic of FA and protrusions in living cells. The MCF7 cells, expressing GFP-PKC θ -iFKBP, FRB and cherry-paxillin, were plated on fibronectin and imaged with spinning disc for 30 mins before addition of rapamycin for 2 hours. The FA dynamic analysis clearly demonstrated that the FA turnover, which was very quiet before rapamycin addition, became very dynamic within 15 mins after rapamycin treatment and these FA dynamics were maintained for at least 2 hours (Figure 4 e, f, g and supplementary movie 4). We observed similar effects on membrane dynamic. Upon addition of rapamycin, the MCF7 cells, expressing GFP-PKC θ -iFKBP and cherry-FRB, exhibited very large and dynamic protrusions (Figure 4 h, i, j and supplementary movie 5). However, the addition of rapamycin didn't affect the focal adhesion and protrusion dynamics when the kinase dead form of GFP-PKC θ -iFKBP was expressed in MCF7 cells (Figure 4k). Thus these data confirmed that the rapid activation of PKC θ is sufficient to induce FA and protrusion dynamics.

PKC θ interacts with FAK to open its conformation

Next we explored the detailed mechanism of FA activation by PKC θ . Since the conformation of inactive FAK has to be opened to become active, we first addressed whether PKC θ could interact with FAK to release its active form. To do this, we performed a co-immunoprecipitation (co-IP) experiment using TNBC cells. We found a specific interaction between endogenous PKC θ and endogenous FAK in MDA-MB436 and HCC38 cells (Figure 5a). In order to test whether PKC θ associates directly with FAK, we carried out *in vitro*

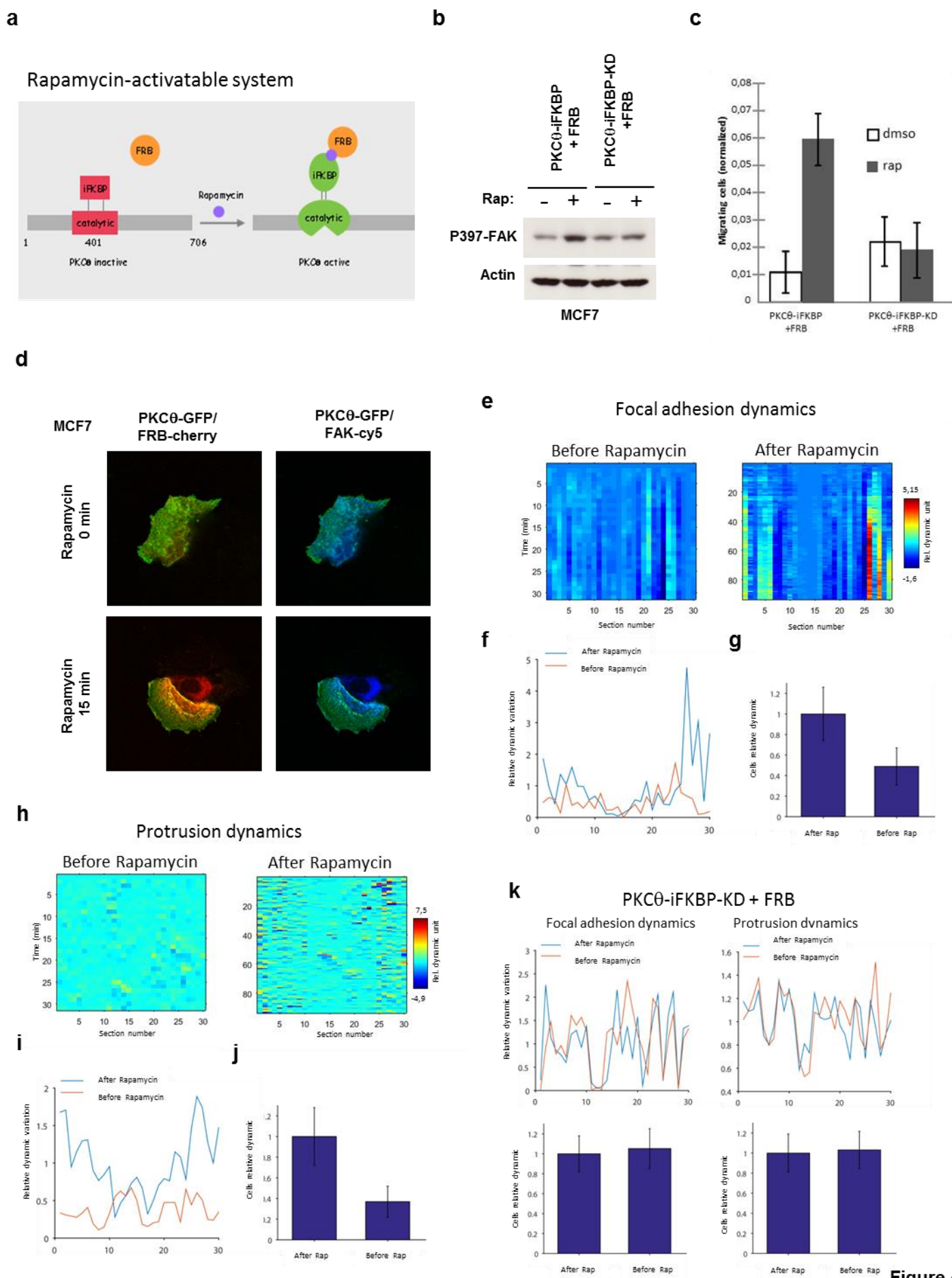


Figure 4

Figure 4. The rapid allosteric activation of PKC θ is sufficient to induce FA and protrusion dynamics. **a.** Schematic representation of the rapamycin-activable system. **b** MCF7 cells were co-transfected with cherry-FRB and either PKC θ iFKBP-CA or PKC θ iFKBP-CA-KD. Two days later, cells were treated with 200 nM Rapamycin (+) or DMSO (-) for 1h and then WCEs were subjected to immunoblotting analysis. **c.** MCF7 cells were co-transfected with pCDNA3.1Luc, cherry-FRB and either PKC θ iFKBP-CA or PKC θ iFKBP-CA-KD. One day later, cells were subjected, in triplicate, to an invasion assay for 48 h as described in Figure 2e. As indicated, 40 nM Rapamycin or DMSO was added to the lower compartment of the boyden chamber. **d.** MCF7 cells were transfected with PKC θ iFKBP-CA-GFP and cherry-FRB. Two days later, cells were treated for 15 mins with 200nM Rapamycin and then cells were fixed and stained with FAK antibody. **e, h.** Heatmap from the indicated time periods of one representative MCF7 cell expressing PKC θ iFKBP-CA-GFP, FRB and cherry-paxillin before and after treatment with 200 nM Rapamycin in order to show the status of focal adhesion (**e**) and protrusion (**h**) dynamics. Each row represents a series of the relative protrusion area from one section of MCF7 cell at the indicated time periods. Positions from 1 to 30 plotted on the x-axis correspond to the section. For all heatmap images, RGB color bars have been used to label the range of the signal dynamics of either focal adhesion area or protrusion area. **f, i.** Quantification of relative focal adhesion (**f**) and protrusion (**i**) dynamic variation in one representative MCF7 cell expressing PKC θ iFKBP-CA-GFP, FRB and cherry-paxillin before and after treatment with 200 nM Rapamycin, as shown in **e** and **h**, plotted as a function of section number. **g, j.** Quantification of the relative percentage of the focal adhesion (**g**) and protrusion (**j**) dynamic variation from the indicated MCF7 cells. n is the number of samples analysed (more than 5 in **g, j**). All error bars indicate \pm s.d., $P < 0.001$ means significant difference by student's t-test. **k. (Top panels)** Quantification of relative focal adhesion (**left panel**) and protrusion (**right panel**) dynamic variation in one representative MCF7 cell expressing PKC θ iFKBP-KD-GFP, FRB and cherry-paxillin before and after treatment with 200 nM Rapamycin plotted as a function of section number. (**Bottom panels**) Quantification of the relative percentage of the focal adhesion (**left panel**) and protrusion (**right panel**) dynamic variation from the indicated MCF7 cells. n is the number of samples analysed (more than 5).

glutathione S-transferase (GST) pull-down experiments in which GST and GST-FAK fusion proteins, preloaded on glutathione-coupled beads, were incubated with purified His-PKC θ . As

detected by western blot analysis, His-PKC θ , which was not retained by GST, associated with GST-FAK fusion protein (Figure 5b). To define the PKC θ and FAK domains implicated in the interaction, we generated a series of deletion mutants that derived from mammalian vectors expressing Flag-PKC θ or HA-FAK, and we transfected them in the low invasive breast cancer cells (MCF7 and ZR75-1). The full length PKC θ tagged with Flag were transfected with the various mutants derived from HA-FAK and inversely, the full length FAK tagged with HA were transfected with the various mutants derived from Flag-PKC θ . Co-IP experiments using anti-HA or anti-Flag antibodies were performed. The deletion of the regulatory domain of PKC θ (Δ Nt) totally disrupted its interaction with FAK, while the mutant deleted from the kinase domain (Δ Ct) are still able to bind to FAK (Figure 5c and Suppl. Figure 5a). Regarding FAK, the deletion of its kinase or C-terminal part did not affect the interaction with PKC θ ; however the deletion of the FERM domain totally abolished the FAK binding with PKC θ (Figure 5d and Suppl. Figure 5b). We tempted to precise more accurately the interacting domains but the structure of both proteins prevented us to go forward. Indeed, the C2-like, C1 or V3 domains from the regulatory domain of PKC θ seemed to bind similarly to FAK (Suppl. Figure 5c) and the deletion of F1, F2 or F3 lobes from the FERM domain of FAK led to very unstable truncated proteins which bothered us to perform suitable co-IP experiment (Suppl. Figure 5d). Therefore, we used GST- pull-down assays to determine which FERM lobes of FAK are implicated in the interaction with PKC θ . First, we confirmed that the FERM domain, but not the kinase or C-terminal region, is sufficient to interact with His-PKC θ , although the kinase domain also exhibited a detectable binding but much weaker (Figure 5e, left panel and Suppl. Figure 5e). Considering the amount of GST fusion proteins detected by coomassie staining (Suppl. Figure 5e), we concluded that the F1 and F2 lobes were mainly involved in the interaction with His-PKC θ while the F3 lobe very weakly participated to it (Figure 5e, right panel and Suppl. Figure 5e). As previously mentioned, the

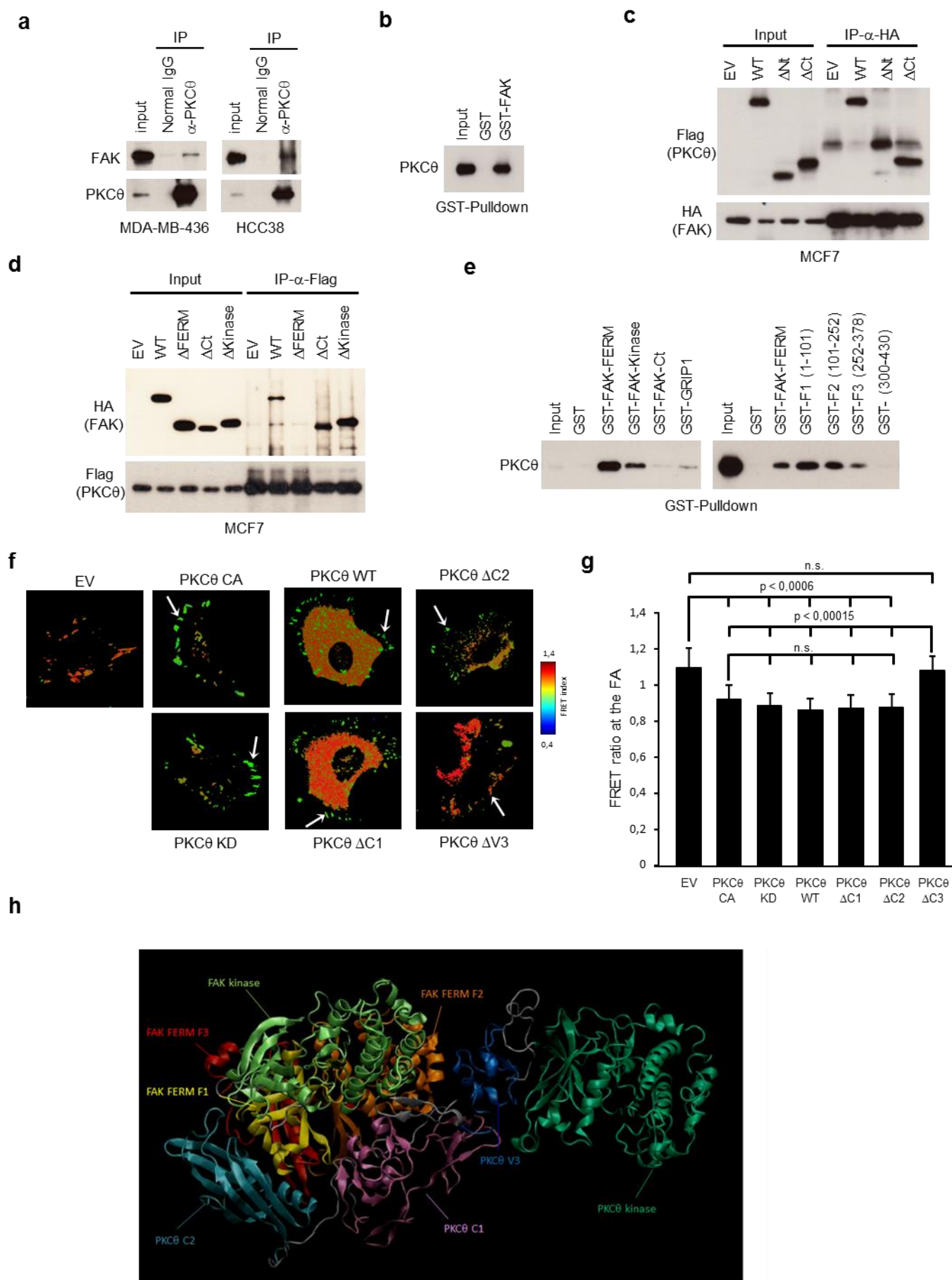


Figure 5

*Figure 5. The regulatory domain of PKC θ interacts with FAK F2 FERM domain to open FAK conformation. a. WCEs from the indicated TNBC cells were immunoprecipitated with an anti-PKC θ monoclonal antibody, and immunoblotted with anti-FAK and anti-PKC θ antibodies. The input corresponds to 2% of WCEs used in immunoprecipitation. b. Purified His-PKC θ was incubated with GST or GST-FAK fusion proteins purified from *E. coli*. Input and pull down samples were analyzed by immunoblotting to detect PKC θ . c. MCF7 cells were co-transfected with HA-FAK wt and either Flag-PKC θ wt (full length) or Flag-PKC θ - Δ Nt (aa 379-706) or Flag-PKC θ - Δ Ct (aa 1-378) or empty vector (EV). Two days later, WCEs were immunoprecipitated with an anti-HA antibody, and immunoblotted with anti-HA and anti-Flag antibodies. The input corresponds to 4% of WCEs used in immunoprecipitation. d. MCF7 cells were co-transfected with Flag-PKC θ wt and either HA-FAK wt (full length) or HA-FAK- Δ FERM (aa 371-1052) or HA-FAK- Δ Kinase (aa 1-370/701-1052) or HA-FAK- Δ Ct (aa 1-701). Two days later, WCEs were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody, and immunoblotted with anti-Flag and anti-HA antibodies. The input corresponds to 4% of WCEs used in immunoprecipitation. e. Purified His-PKC θ was incubated with the following GST fusion proteins purified from *E. coli*: GST-FAK (full length), GST-FAK-FERM (aa 1- 370), GST-FAK-Kinase (aa 371-700), GST-FAK-Ct (aa 701-1052), GST-FAK-F1 (aa 1-101), GST-FAK-F2 (aa 102-252), GST-FAK-F3 (aa 253-378), GST-FAK (aa 300-430). GST and GST-GRIP1 (aa) were used as negative control. Input and pull down samples were analyzed by immunoblotting to detect PKC θ . f. Representative FAK conformational biosensor FRET images of MCF7 cells expressing either PKC θ CA or PKC θ KD or PKC θ WT or PKC θ Δ C1 or PKC θ Δ C2 or PKC θ Δ V3 or empty vector (EV). A RGB color bar has been used to show the range of FRET ratio. Arrows mark one of the individual focal adhesions in different indicated MCF7 cells, which have been used for the quantification of average FRET ratio from individual cells. g. Quantification of the average FAK conformational biosensor FRET ratio from different indicated MCF7 cells. The number of the analyzed cells at each condition is 12. h. Molecular modeling showing the interaction surfaces in a tridimensional conformation between PKC θ and FAK proteins. The different domains of both proteins are indicated.*

F2 FERM lobe is critical to keep FAK in the closed state by interacting with the FAK kinase domain. A large basic patch in the F2 lobe was identified as a key motif for FAK opening and

activation (Mol Cell Biol. 2004 ;24(12):5353-68.; Mol Cell Biol. 2006;26(13):5155-67.; Mol Cell Biol. 2008;28(1):201-14); However, in our case, the mutation of this basic patch did not affect the interaction between FAK and PKC θ as well as the activation of FAK by PKC θ . (Suppl. Figure 6a). To examine whether PKC θ interacts with the FERM domain to release FAK kinase activity, we developed a FAK conformational biosensor as previously reported (J Cell Sci. 2009;122:656-66) (Suppl. Figure 6b). To study FAK conformation changes in response to active PKC θ , MCF7 cells, transiently transfected with the FAK conformational biosensor together with active PKC θ expression vector or empty vector, were stimulated for 4h with serum to properly localize the biosensor at FA. In the control condition (EV), the FAK biosensor displayed a high FRET ratio indicating that FAK conformation was closed. On the contrary, the presence of active PKC θ led to an opened conformation as observed by the low FRET ratio (Figure 5f and 5g). Interestingly, the expression of kinase dead PKC θ was still able to open FAK protein indicating that the catalytic activity of PKC θ was not required to induce FAK conformation change (Figure 5f and 5g). To further characterize which part of the PKC θ regulatory domain (domain interacting with FAK) was involved in the FAK opening, we compared the effect of PKC θ wild type (WT) with the one of PKC θ deleted of either C2-like, or C1 or V3 domain on the FAK conformation change. Firstly, PKC θ WT was as efficient as active PKC θ to open FAK (Figure 5f and 5g). Secondly, while the deletion of C2-like or C1 domains did not modify the opening effect of PKC θ on the FAK conformation, the PKC θ mutant deleted of V3 domain was no longer able to change FAK conformation (Figure 5f and 5g). Furthermore, molecular modeling based on the crystal structure of the entire PKC θ protein, and the FERM and kinase domains of FAK confirmed that the interaction surfaces in a tridimensional conformation are the regulatory domain of PKC θ , and the F2 and F3 lobes of FAK (Figure 5h and Suppl. Figure 6c). These findings let us

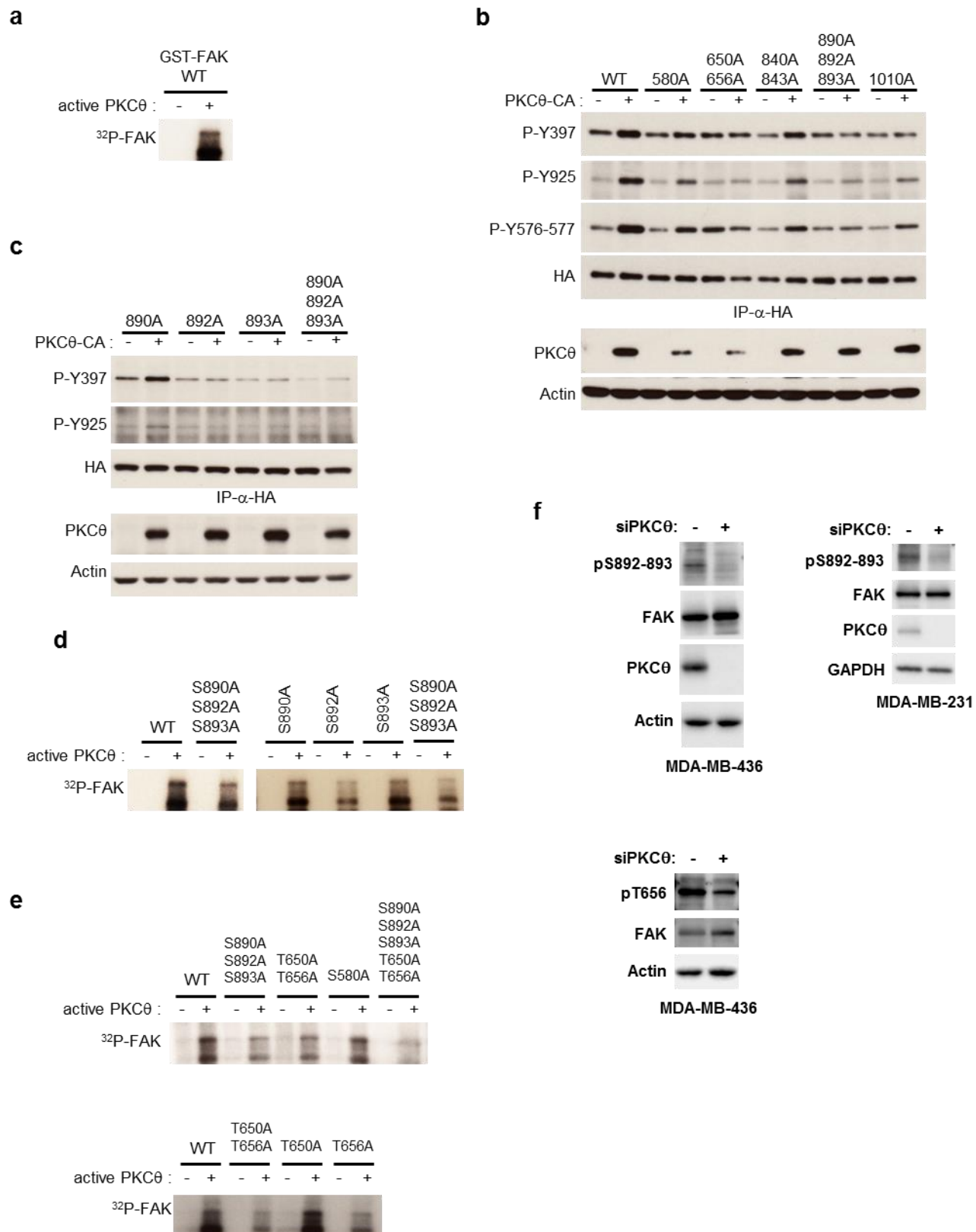


Figure 6

Figure 6. PKC θ phosphorylates FAK to control FAK activation and FAK kinase activity. a. Recombinant GST-FAK wt fusion protein was used as substrate in in vitro kinase assay in the absence (–) or presence of recombinant active His-PKC θ . Phospho - FAK (32P-FAK) was detected by autoradiography. b and c. MCF7 cells were co-transfected with HA-FAK wt or various HA-FAK mutants in the presence (+) or absence (–) of PKC θ -CA expression vector. The activation of immunoprecipitated FAK variants was tested by immunoblotting using antibodies against pY397-FAK, pY576/577-FAK, pY925-FAK. The presence of PKC θ and the equal amount of immunoprecipitated FAK variants were detected using antibodies against PKC θ and HA, respectively. d and e. Recombinant GST-FAK wt or mutant fusion proteins were used as substrate in in vitro kinase assay in the absence (–) or presence of recombinant active His-PKC θ . Phospho - FAK (32P-FAK) was detected by autoradiography. f. The indicated TNBC cell lines were transfected with two different siRNAs (3.6 nM each) targeting the PRKCQ gene. After two successive 48h-transfections, WCEs were subjected to immunoblotting analysis using antibodies against pS892-893-FAK, pT656-FAK, FAK and PKC θ . Anti-Actin and anti-GAPDH antibodies were used to confirm equal loading.

proposed one model in which the regulatory domain of PKC θ interacts with FAK F2 FERM domain to open FAK conformation via the V3 region of PKC θ .

PKC θ phosphorylates FAK to induce its activation

To further address the relationship between FAK and PKC θ , we examined whether FAK could be a substrate of PKC θ . To verify our hypothesis, we subjected GST-FAK fusion protein to an *in vitro* kinase assay with purified His-PKC θ enzyme. As shown in Figure 6a and Suppl. Figure 7a, PKC θ specifically phosphorylated FAK *in vitro*. To pinpoint the phosphorylated residues, we performed nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses on purified HA-FAK that was overexpressed in MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells expressing active PKC θ or not (Suppl. Figure 7b). The analyses allowed us to identify several potential sites in the kinase and C-terminal domains of FAK (Suppl. Figure

7c). In order to determine the sites implicated in the PKC θ -induced FAK activation, we mutated the identified sites into alanine to prevent the phosphorylation by PKC θ . The various HA-FAK mutants were transfected in MCF7 in the presence or not of active PKC θ . Alanine mutagenesis revealed that the phosphorylation on the serine 890-892-893 was critical for PKC θ -induced FAK activation while others residues was less or not implicated in this control (Figure 6b). The discrimination between these residues by single point mutation allowed us to conclude that the phosphorylation on serine 892-893 and was implicated in the FAK activation by PKC θ (Figure 6c). These phosphorylation sites were then confirmed by *in vitro* kinase assay (Figure 6d). To pinpoint additional specific phosphorylation sites that are not involved in FAK activation, we combined alanine mutagenesis with *in vitro* kinase assay and thus identified the threonine 656 of FAK as another PKC θ specific phosphorylation site (Figure 6e). Two custom phosphospecific antibodies against FAK phosphoserine 892-893 (pFAK S892-893) and phosphothreonine 656 (pFAK T656) were generated and used to further confirm the specificity of the phosphorylation by PKC θ . Similarly to FAK inhibition (Suppl. Figure 7d), PKC θ inhibition strongly decreased the endogenous level of pFAK S892-893 and pFAK T656 in TNBC cells (MDA-MB-231 and MDA-MB-436) (Figure 6f). These phosphospecific antibodies specifically detected the FAK protein phosphorylated on S892-893 or T656 since no signal appeared with both non-phosphorylatable FAK mutants in an *in vitro* PKC θ kinase assay (Suppl. Figure 7e). Altogether, these results demonstrated that PKC θ phosphorylated FAK on serine 892-893 and threonine 656 to control FAK activation.

Phosphorylated FAK is necessary for PKC θ -induced invasion

To further assess the functional role of FAK phosphorylation, we checked the localization of endogenous phosphorylated FAK (pFAK S892-893 and pFAK T656) and of endogenous active PKC θ (pPKC θ T538). Interestingly, phosphorylated FAK and active PKC θ were distributed at the leading edge of migrating polarized MDA-MB-231 cells (Figure 7a) as well

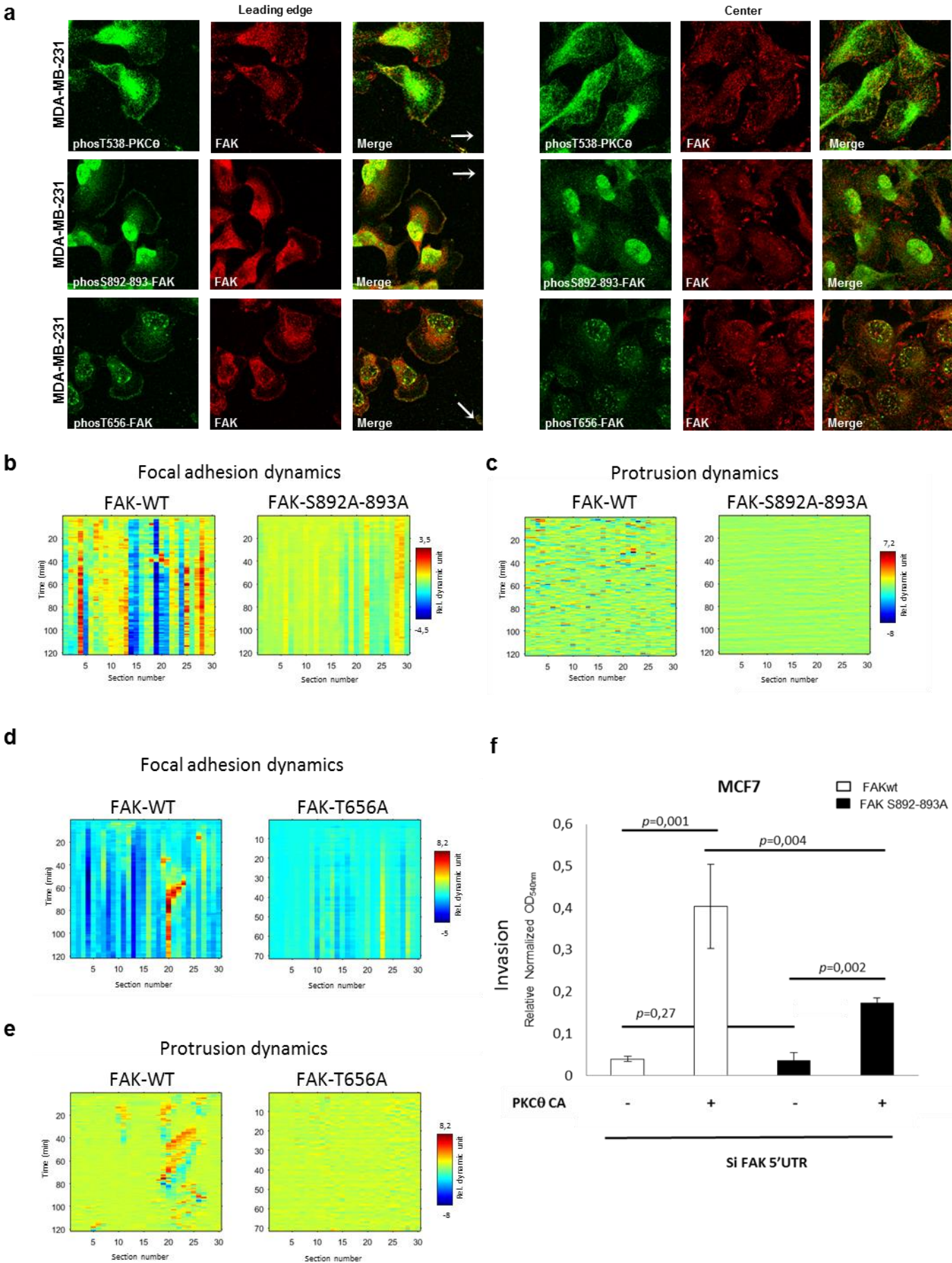


Figure 7

Figure 7. Phosphorylated FAK (pFAK S892-893) is a critical mediator of PKC θ effects on FA and membrane dynamics, and on cell invasion. a. Confluent MDA-MB-231 cells were subjected to a wound healing assay for 16h and then were fixed and stained with antibodies against pT538-PKC θ , pS892-893-FAK, pT656-FAK and FAK. Images represent the cells located at the migration leading edge or in the confluent center region far from the wound (Center). The white arrow indicates the migration direction. b, c. Heatmap from the indicated time periods of one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin and siFAK-5'UTR together with FAK WT or FAK S892-893A in order to show the status of focal adhesion (b) and protrusion (c) dynamics. d, e. Heatmap from the indicated time periods of one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin and siFAK-5'UTR together with FAK WT or FAK T565A in order to show the status of focal adhesion (d) and protrusion dynamics (e). Each row (b, c, d, e) represents a series of the relative protrusion area from one section of MCF7 cell at the indicated time periods. Positions from 1 to 30 plotted on the x-axis correspond to the section. For all heatmap images, RGB color bars have been used to label the range of the signal dynamics of either focal adhesion area or protrusion area. f. MCF7 cells were transfected with 3.6 nM of siRNA targeting the 5'UTR region of the FAK gene and 24h later, cells were co-transfected with pCDNA3.1Luc and the HA-FAK variants in the presence (PKC θ -CA) or absence (EV) of active PKC θ . One day later, MCF7 cells were subjected, in triplicate, to an invasion assay for 48 h as described in Figure 2f.

as at the leading edge of MDA-MB-231 cells polarized by serum stimulation (Suppl. Figure 8a). More precisely, phosphorylated FAK and active PKC θ were located at the lamellipodial protrusion where the nascent focal adhesions are formed (Nat Cell Biol. 2008;10(9):1039-50), and they were completely excluded from the mature adhesions in TNBC cells (Figure 7a and Suppl. Figure 8a). Considering the localization of phosphorylated FAK (pFAK S892-893 and pFAK T656), we speculated that PKC θ -induced FAK phosphorylation could play a role in the control of FA dynamic. To corroborate our hypothesis, we performed a rescue experiment with cherry-FAK WT or its nonphosphorylatable mutants S892-893A or T565A in breast cancer cells depleted from endogenous FAK. We transfected MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells

expressing active PKC θ with siRNA targeting the 5' untranslated region of FAK. The ectopic expression of cherry-FAK WT efficiently restored the dynamic of FA labelled with GFP-paxillin while the ectopic expression of its nonphosphorylatable mutants S892-893A or T565A failed to rescue the FA dynamic and led to a phenotype similar to the control cells (MCF7 cells, or MCF7 cells expressing active PKC θ and depleted from endogenous FAK) (Figure 7b, d and Suppl. Figure 8b, c). We obtained similar results on the protrusion dynamic (Figure 7c, e and Suppl. Figure 8d, e). Consistent with the result obtained with the kinase dead form of PKC θ (Figure 5f and g), the expression of nonphosphorylatable mutants S892-893A or T565A were still able to open the FAK conformation measured thanks to the FAK conformational biosensor (Suppl. Figure 8f) indicating that this phosphorylation mediated by PKC θ was not involved in the FAK opening. Since phosphorylated FAK (pFAK S892-893) is critical for the FAK activation (Figure 6b) as well as for the FA and protrusion dynamic controlled by PKC θ , we next investigated its function in the control of PKC θ -induced invasion. The ectopic expression of FAK WT restored the effect of PKC θ on the invasive ability of MCF7 cells depleted from endogenous FAK; however the PKC θ -induced invasion was not recovered upon ectopic expression of its nonphosphorylatable mutants S892-893A (Figure 7f). To conclude, these findings demonstrated that phosphorylated FAK (pFAK S892-893 and pFAK T656) is a critical mediator of PKC θ effects on FA and membrane dynamics and thereby on cell invasion.

DISCUSSION

Engagement of integrins and other adhesion receptors is the main well-characterized activator of FAK. However, besides these adhesion receptors, a large variety of stimuli, acting either on specific surface receptors or on intracellular molecules, has been described to also activate FAK. Particularly, the use of the phorbol esters that activate classical and novel PKCs or the treatment with broad PKC inhibitors have shown that PKCs are able to stimulate tyrosine

phosphorylation of FAK in a number of cell types (Exp Cell Res. 2001 Apr 1;264(2):296-306) (J Biol Chem. 1996 Nov 1;271(44):27895-901) (J Biol Chem. 1996 Nov 15;271(46):28942-6)(MH Disatnik, TA Rando - Journal of Biological Chemistry, 1999). Nevertheless, the members of the PKC family that directly induce FAK activation have not been clearly identified, especially in the context of breast cancer. Here, we find that PKC θ activates FAK by direct interaction and phosphorylation, and even more surprisingly, this activation seems to be specific to PKC θ in TNBC cells since the inhibition of others PKC family members, especially the ones strongly expressed in TNBC cells, didn't impair FAK signaling in these cells. These data strongly suggest that PKC θ is one of the main activator of FAK signaling in TNBC.

As mentioned, PKC θ interacts directly with FAK and its physic interaction occurs through the FAK FERM domain. Several FERM binding partners have been already identified for FAK. Most of them are growth factor receptors that activate FAK by tyrosine phosphorylation and the others FERM binding partners have been described to regulate the cytoskeleton. Very interestingly, PKC θ presents several particularities compared to all these FAK FERM binding partners. Firstly, PKC θ activates FAK through phosphorylation on serine and threonine residues while others FERM binding partners that activate FAK are tyrosine kinase. Secondly, PKC θ , not only activates FAK, but also regulates lamellipodial protrusion dynamic strongly suggesting it could also control cytoskeletal remodeling at the leading edge of motile cells. Thirdly, a basic patch located in the F2 lobe of the FAK FERM domain is critical for the interaction between FAK and some of its partners while in our case, this basic patch is dispensable for the interaction and activation of FAK by PKC θ .

Of particular interest is the interaction that has been reported between FAK and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate [PI(4,5)P₂] (Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 ;111(31):E3177-86). Similarly to PKC θ , PI(4,5)P₂ activates FAK via a conformational

change; however this activation seems to occur differently. Indeed, PI(4,5)P₂ requires the integrity of the basic region for its interaction with FAK. Moreover, PI(4,5)P₂ induces FAK clustering that is likely due to direct protein-protein interactions among FAK molecules. Indeed, it has been reported that FAK dimerization through a specific site that is the residue W266 is involved in FAK activation (EMBO J. 2014 Feb 18;33(4):356-70). In our system, the activation of FAK by PKC θ is independent of this specific site since the point mutation W266A that has been described to disrupt dimerization didn't have any impact on FAK-PKC θ interaction as well as on PKC θ -mediated FAK activation. However, these results cannot let us completely exclude the possible implication of FAK clustering. Actually, the point mutation W266A only partially disrupt FAK dimerization in our cellular model suggesting that others residues may be important for the dimer formation. Further studies have to be performed to fully clarify the importance of FAK clustering in PKC θ -mediated FAK activation in TNBC cells.

Finally and even more interestingly, we show that PKC θ V3 domain, which is specific to PKC θ and has been implicated in its selective control of T lymphocytes activation, is responsible for PKC θ effects on FAK opening. The implication of this PKC θ particular domain that cannot be found in other PKCs, may thus explain the specificity of PKC θ on FAK activation over other PKCs in breast cancer cells. Altogether, these data show that PKC θ is able to induce FAK opening in a very specific way, being independent of the classically involved F2 basic patch and FAK dimerization, but dependent on PKC θ specific V3 domain.

Our data show that PKC θ not only controls FA dynamic but also regulates protrusion dynamic suggesting that PKC θ may modulate cytoskeletal rearrangements. More and more evidences demonstrate that PKC θ controls cytoskeletal remodeling in various cell types. In endothelial cells, PKC θ has been shown to control actin polymerization (J. Biol. Chem. 272, 28704–28711, 1997) and to modulate the focal adhesion formation through the increased

expression of TAP20, a protein interacting with $\beta 5$ integrin (J Cell Biol. 1999 Nov 29;147(5):1073-84). In the context of T cell receptor engagement, PKC θ is also able to control actin polymerization in T lymphocytes through the release of WASP (.Mol. Cell 10, 1269–1281, 2002). Upon T-cell activation, PKC θ also controls the activation of small GTPase Rap1 by phosphorylating RapGEF2 and thereby regulates LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion (Blood 112, 4617–4627, 2008). Moreover, PKC θ recruitment to the membrane is critical for the polarization of the T lymphocyte's microtubule-organizing center during the formation of the immunological synapse (Nat Immunol. 2011 ;12(7):647-54). In our cellular model, PKC θ modulates the dynamic of the RhoGTPases activity, especially the one of RhoA activity strongly suggesting the implication of this regulation in the control of protrusion dynamic. This regulation is important for the control of cell invasion since the depletion of RhoA completely blocks the PKC θ -induced invasion. We found that PKC θ controls RhoA activity dynamic through FAK activation. However, we can speculate that additional mechanisms could be involved in this control such as the phosphorylation of RhoGEF by PKC θ as described in T cell for the control of Rap1.

Our findings indicate that PKC θ controls both adhesion and protrusion dynamics in an integrated manner. We have observed that the phosphorylations on S892-893 are strongly implicated in PKC θ effects on protrusion and adhesion dynamics. Several elements enable us to explain this effect. First of all, we observe that the p892-893FAK is excluded from large mature adhesion and that the FAK S892-893E mutant affects FAK interaction with paxillin. What is more, the consequences of S892-893 phosphorylations are similar to those previously described of other phosphorylation in this FAK region (close to or in the FAT domain). Indeed, it has been shown that the Y925 phosphorylation excludes FAK from focal adhesions (citation). Moreover, Deramaudt et al., have shown that an unphosphorylatable Y925F FAK mutant display higher interaction with paxillin and affects adhesion and protrusion dynamics

(Deramaudt et al., 2011). Finally, a mutant of FAK FAT domain with higher levels of Y925, Y861 and S910 phosphorylations display weakened interaction with paxillin, seems to be at least in part excluded from focal adhesion while positively enhancing adhesion and protrusion dynamics (Kadaré et al., 2014). Thus, taken these results into account, we are able to propose the following model to explain PKC θ effects on adhesions and protrusions dynamics. PKC θ phosphorylations of FAK on 892-893 at the leading edge destabilize the FAK/paxillin interaction thus leading to adhesion disassembly. In parallel, the destabilization of the FAK/paxillin interaction could favor the FAK/p190 RhoGEF interaction that also implicates the same FAT domain (Zhai et al., 2003), thus leading to new protrusion formation. Following S892-893FAK dephosphorylation, the pool of “*freed*” FAK is able to induce new adhesion until a new cycle of FAK S892-893 phosphorylation occurs. Altogether, this model places PKC θ at center of an integrated control of protrusion and adhesion dynamics at the leading edge of migrating cells.

TNBC is a highly aggressive form of breast cancer that is very difficult to treat due to the lack of a specific molecular target for therapy. It is a high priority in cancer research to discover new molecular targets to develop novel therapies for this aggressive form of breast cancer. Here we believe that we have discovered the PKC θ /phosphoFAK axis as a potential marker for TNBC diagnosis and therapy. PKC θ is an attractive therapeutic target for TNBC since its expression is restricted to a few normal cell types while it is highly expressed in TNBC. Our data show that the loss of PKC θ strongly blocks the high metastatic activity of TNBC cells supporting that the therapeutic use of specific PKC θ inhibitors could lead to a reduction of metastasis formation. Interestingly, PKC θ activation has been implicated in other types of cancer such as leukemia and gastrointestinal stromal tumors, and also in various pathologies such as autoimmune and inflammatory diseases and diabetes. PKCs inhibitors have been

tested in preclinical and clinical studies in the context of immunological disorders, and more specific and selective inhibitors of PKC θ are under development and tested in preclinical studies.

In summary, our findings revealed a new mechanism of FAK activation and identified PKC θ as a critical regulator of FA and protrusions dynamic, and indicate that PKC θ /phosphoFAK axis could be a therapeutically relevant marker of TNBC aggressiveness.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The low invasive breast cancer cell lines (MCF7, BT474, ZR-75.1) and TNBC cell lines (MDA-MB-231, HCC38, MDA-MB-436, BT549, MDA-MB-157, HS578T) were purchased from the ATCC and maintained in standard culture medium as recommended by the ATCC. The stable cell lines MCF7-PKC θ -CA Tet-Off were previously described (Belguise, Oncogene, 2012) and the inhibition of PKC θ -CA expression was induced by treatment with 0.01 μ g/ml doxycycline (Sigma) for 48 h. The MDA-MB-231-LM2-4175 cell lines, described previously (Nature. 2005. 436:518-24), is a gift from J. Massagué (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York). Cell lines were authenticated by Eurofins Genomics GmbH and were routinely tested for mycoplasma.

shRNA stable cell lines

The cell lines MDA-MB-231-LM2-4175 stably expressing shRNA PKC θ or shRNA control were generated by lentiviral infection. The lentivectors were produced by triple transfection method. Briefly, 10⁶ 293FT cells are seeded on each T75 flask the day before the calcium phosphate-mediated transfection. Each T75 Flask of 80% confluence 293 cells were cotransfected with 10 μ g of the pLKO-Tet-On-ShRNA-PKC θ or pLKO-Tet-On-ShRNA-scramble transfer vector plasmid, 10 μ g of the p8.91 packaging plasmid and 5 μ g of the pVSVg envelope plasmid. Six hours after transfection, the medium was replaced by 12 ml of OptiMEM medium (Life Technologies, ThermoFisher Scientific). Twenty-six hours after transfection, the conditioned medium was collected, cleared by centrifugation and filtered through 0,45 μ m-pore-size PVDF filters. The transduction experiments were realised in 6-well plates. 50 000 MDA-MB-231-LM2-4175 cells were plated in 1mL of total transduction medium containing 500 μ l of lentiviral conditioned medium, 500 μ l of OptiMEM medium and 6 μ g/mL of protamine sulfate. Twelve hours after transduction, medium was removed and

renewed by DMEM 10% SVF. Transduced cells were selected with puromycin (1 μ g/mL, Hyclone). Production and cells transductions were fulfilled in Plateau de Vectorologie, Pôle Technologique du CRCT (UMR 1037 Inserm, Toulouse3).

Transient transfection

For plasmid transfections, the low invasive breast cancer cells were transfected using the GenJet DNA Pre-Optimized transfection reagent For MCF7 (tebu-bio) and the TNBC cells were transfected using the GenJet DNA transfection reagent Pre-Optimized For MDA-MB231 (tebu-bio) according to the manufacturer's protocol. For siRNA transfections, duplexes (3.6 nM final) were introduced into the cells using reverse transfection using the Interferin transfection reagent (Ozyme) according to the manufacturer's protocol. When two successive siRNA transfection rounds were performed, cells were re-plated 48 h after the first transfection.

Plasmids

Constitutively active PKC θ (PKC θ -CA, mutation A148E) and kinase dead PKC θ (PKC θ -KD, mutation K409R) subcloned in the pEF4/His expression vector, were generously provided by A. Altman (San Diego, CA). The pCDNA3.1-Luc plasmid was a gift of P. Balaguer (Montpellier, France). The human wt full length PKC θ and FAK were cloned in the Flag and pHM6 vectors, respectively.

The deletion or truncated mutants of PKC θ and FAK cloned in the Flag, pHM6 or pGEX vectors (Flag-PKC θ -Nt, Flag-PKC θ -Ct, HA-FAK-FERM, HA-FAK-Ct, HA-FAK-Kinase, GST-FAK, GST-FAK-FERM, GST-FAK-Kinase, GST-FAK-Ct, GST-FAK-F1, GST-FAK-F2, GST-FAK-F3, FAK conformational biosensor) were constructed using InFusion Clontech technology and the primers indicated in Supplementary Table 1.

To generate FAK conformational biosensor, CFP was inserted at site 391 and YFP was inserted at the N-terminus.

The phospho-mimetic or nonphosphorylatable mutants were constructed using the Quick Change Lightning Site Directed Mutagenesis Kit from Agilent Technologies and the primers indicated in Supplementary Table 1.

Cherry-FAK and cherry-paxillin were cloned into pmCherry NBC1 vector. GFP-Paxillin was cloned into pEGFP-N1 vector.

PKC θ iFKBP-CA, PKC θ iFKBP-CA-KD, cherry-FRB were cloned into pEF4 vector and GFP-PKC θ iFKBP-CA and GFP-PKC θ iFKBP-CA-KD were cloned into pEGFP-N1 vector. The iFKBP domain consisted of amino acids Thr22 through Glu108 of human FKBP12 and has been inserted in position 401 of human PKC θ .

RhoA, Rac1, Cdc42 FRET probe were cloned into pTriEx vector (Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM. Nature. 2006 Apr 20;440(7087):1069-72).

Human *PRKCQ* and Control shRNA constructs were generated by ligating the following annealed oligomers into the unique AgeI and EcoRI sites of pLKO.1-puro vector:

PRKCQ forward:

5'CCGGCATCCAAAGCTGCCACAAGTTCTCGAGAACTTGTGGCAGCTTTGGATGTT
TTTG-3'

PRKCQ reverse:

5'AATTCAAAAACATCCAAAGCTGCCACAAGTTCTCGAGAACTTGTGGCAGCTTTG
GATG

Control forward:

5'CCGGAGGTAGTGTAATCGCCTTGCTCGAGCAAGGCGATTACACTACCTTTTTT-3'

Control reverse:

5'AATTAAAAAAGGTAGTGTAATCGCCTTGCTCGAGCAAGGCGATTACACTACCT-
3'

Small interfering RNAs

All siRNA duplexes were synthesized by Eurofins Genomics GmbH.

For efficient PKC θ inhibition, we transfected a pool of two different siRNAs whose sequences are:

5'-GACCATCTCTGCAGATTAA-3' ; 5'-ACCACCGTGGAGCTCTACT-3'

The sequence of the others siRNAs are:

siFAK: 5'-GCGATTATATGTTAGAGATAG-3'

siFAK- 5'UTR: 5'-TGACAGATACCTAGCATCTAGCAAA-3'

siipaxillin: 5'-GTGTGGAGCCTTCTTTGGT-3'

siPKC α : 5'-CCGAGTGAAACTCACGGACTTCAAT-3'

siPKC ϵ : 5'-GCCCCCTAAAGACAATGAAG-3'

siPKC δ :

siRhoA:5'-AAGAAGTCAAGCATTTCTGTC-3';

siRac:5'-AAGGAGATTGGTGCTGTAAAA-3';

siCdc42: 5'-AAGATAACTCACCACTGTCCA-3'

siControl: 5'-AGGTAGTGTAATCGCCTTG-3'

Invasion assays

48 hours after transfection, a suspension of 300 000 cells was seeded in the upper compartment of a 8-mm diameter polycarbonate filter Transwell insert (8 μ m pore size , Costar, Cambridge, MA, USA) precoated with 30 μ g Matrigel (BD Bioscience) and incubated at 37 °C for 48h for the low invasive breast cancer cells and 16 h for TNBC cells. In parallel, 15 000 cells were plated in 24-well plates as a proliferation control and 250 000 in 12-well plates for immunoblotting analysis. Cells that invaded to the lower side of the filter were quantified either by the mitochondrial dehydrogenase enzymatic assay using 3 (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenol tetrazolium bromide (MTT) and OD540 determination, or by luminescence for plasmid transfected cells. In this last case, the cells were lysed with a

luciferase lysis buffer (Promega) and the luciferase activity was quantified with a Berthold Centro LB 960 luminometer. The same assay used in each case was used to quantify the cells plated as proliferation control. Then, the value (OD540 or luciferase activity) obtained for the invading cells were normalized by the value measured for the proliferation control cells. Each condition was performed as triplicates.

Antibodies and reagents

The FAK, pY397-FAK, pY576/577-FAK, pY925-FAK, Src, pY416-Src, Paxillin, pY118-Paxillin, PKC θ (western blot) antibodies were ordered from Cell Signalling Technologies. The pY31-Paxillin antibody was from Invitrogen. The PKC θ and FAK antibodies (for immunofluorescence) are from BD biosciences. The pT538-PKC θ antibodies used for immunofluorescence and for western blot were from Santa Cruz Biotechnology and Invitrogen, respectively. Anti-HA and anti-Flag antibodies were from Santa Cruz Biotechnology and Sigma, respectively. The actin and secondary peroxidase conjugated mouse antibodies were from Sigma, and the secondary peroxidase conjugated rabbit antibody was from Jackson ImmunoResearch. Alexa Fluor 488, 555, 647 conjugate secondary antibodies were from Invitrogen.

The pS892-893-FAK and pT656-FAK antibodies were obtained after immunization of rabbits with the CASLSpSpPADSYNE and PTLYSLMTpKC peptides coupled to keyhole limpet hemocyanin, respectively. They were produced and affinity chromatography purified by Eurogentec.

Rapamycin was purchased from LC Laboratories, Fibronectin was from BD Biosciences.

Immunofluorescence

For pY118-Paxillin and pY925-FAK antibody staining, cells grown on glass coverslips were fixed during 20 minutes with 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline). For pT538-PKC θ and pS892-893-FAK, pT656-FAK, FAK antibody staining, cells grown on glass

coverslips were fixed during 20 minutes at -20°C using an ethanol/acetone solution (50/50). Fixed cells were washed in PBS, exposed to IMAGE-IT FX SIGNAL ENHANCER (Invitrogen) during 30 minutes and blocked during 30 minutes with a 1% BSA PBS-0.03% Tween (PBST) buffer before being incubated overnight at 4°C with a solution containing the primary antibodies of interest (PBST-1%BSA, 1/50 antibody dilution). After 3 PBS washes, cells were incubated with fluorescent labelled secondary antibody (PBST-1%BSA, 1/400 antibody dilution). After 3 washes, the slides were mounted using ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen). Alternatively, ProLong Diamond Antifade Reagent (Invitrogen) was used when fluorescent tagged proteins were present.

Live cell imaging

Cells were plated on fibronectin-coated coverglass (2-well Lab-Tek with 10 µg/ml fibronectin) 16 h before imaging and then transferred into complete medium without phenol red. Live cell imaging was performed in a CO₂ and thermo-regulated chamber using a spinning disk microscope equipped with a 63X oil inverted objective. Time-lapse movies were taken at 1 min time intervals.

FRET images of live cells were acquired with a Zeiss LSM710 microscope. A 458 nm laser was used to excite the sample. CFP and YFP emission signals were collected through channel I (470–510 nm) and channel II (525–600 nm), respectively. To capture single, high-resolution, stationary images, a 40X/1.3 oil inverted objective was used. CFP and YFP images were acquired simultaneously for most of the experiments. Sequential acquisition of CFP and YFP channels in alternative orders were tested and gave the same result as simultaneous acquisition.

Image processing and data analysis

Images were processed with MATLAB and Image J.

For Focal adhesion dynamic, original images were processed by the high pass filter in ImageJ, and then the filtered images were thresholded by an empirically determined value set to identify adhesion pixels. For protrusion dynamic, original images were processed by the Gaussian blur in imageJ, and the blurred images were thresholded by an empirically determined value set to identify the cell edge. In both cases, the center signals were removed automatically by Matlab in order to analyse the signal dynamics at the cell edge. Then the cell was equally divided into 30 sections also by Matlab. For each signal at each section, images at all time windows were subtracted by the first image signal, in order to get the relative signals to the signal at the beginning of time series of imaging. All these relative signals at each section and each time point have been used to generate the heatmap, automatically by Matlab. The heatmap shows the increase and decrease levels of FA or membrane area compared to time 0: red color marks the increase level and blue color marks the decrease level.

For all FRET images, CFP and YFP images were first processed by ImageJ software. A background region of interest was subtracted from the original image. The YFP images were registered to CFP images using the TurboReg plugin. Gaussian smooth filter was then applied to both channels. The YFP image was thresholded (for FAK FRET, threshold processing is completely different from the small GTPase FRET, so that the signals mainly at focal adhesion have been focused) and converted to a binary mask with background set to zero. The final ratio image was generated with the MATLAB program, during which only the unmasked pixel was calculated.

For small GTPases FRET dynamic, the center signals were removed from the processed FRET in order to analyse the signal FRET dynamics at the cell edge. All these relative signals at each section and each time point have been used to generate the heatmap, automatically by Matlab. The heatmap shows the increase and decrease levels of relative FRET signals

compared to time 0: red color marks the increase level and blue color marks the decrease level.

Wound Healing

For wound healing experiments, 0.5×10^5 MDA-MB-231 were seeded on a 22 mm wide glass coverslip in 12-well plate. When cells had reached confluence (24 hours later), a scratch was made using the tip of a P1000 cone. The cells were let to migrate during 16 hours at 37°C and were then fixed using ethanol/acetone.

Cells extracts, Western Blots and Immunoprecipitation experiments.

Cells were lysed at 4°C in a lysis buffer containing 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 40 mM Tris (pH 8) and a cocktail of protease/phosphatase inhibitors, and whole cell extracts were subjected to immunoblotting. For co-immunoprecipitation, 1000 µg total protein extracts were incubated under agitation at 4°C during 2 hours with protein A-sepharose beads (GE-Healthcare) and 0.5µg of non-immunized antibody (mouse or rabbit) for preclearing. The extracts were then incubated overnight at 4°C with 1µg of the antibody directed against the precipitated protein before being incubated with protein A-sepharose beads for 2 hours at 4°C. For mass spectrometry analysis, the MCF7-PKCθ -CA tet-off cells were seeded with or without doxycycline at 2.4 million cells per 150mm petri dish. The next day, the cells were transfected with the FAK WT expression vector. Two days after transfection, cells were lysed at 4°C in above mentioned lysis buffer. Eight immunoprecipitations were performed for both conditions, MCF7-cont (with dox) + FAK and MCF7-PKCθeta-CA (without dox) + FAK, on 500 µg of total extracts which were preincubated with 20 µl Protein A sepharose beads for 2 h at 4 ° C in a 200 µl volume of lysis buffer. The supernatant was then incubated overnight at 4 ° C with 4 µl of FAK antibody (CST). The next day, 20 µl of Protein A sepharose beads are added for 2 h at 4 ° C. In both cases, the beads were washed 5 times with the lysis buffer, then

the precipitated denatured proteins were loaded for western blot analysis or mass spectrometry analysis.

In-gel tryptic digestion, nanoLC-MS/MS analysis and database searches.

For mass spectrometry analysis, HA-FAK was overexpressed in MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells expressing active PKC θ or not and purified as described above. The beads were then taken up in 7 μ l of 1X Laemmli sample buffer containing 25 mM DTT for protein elution and reduction during 30 min at 56 ° C. Samples were then alkylated in 75 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. The eight immunoprecipitates were then pooled and equal volume of each condition was loaded on 10% SDS-polyacrylamide gel. After protein separation, the acrylamide gel was stained using Quick Coomassie Stain (Generon). The band corresponding to purified HA-FAK protein in each condition FAK (Suppl. Figure 7b) was excised and subjected to in-gel tryptic digestion using modified porcine trypsin (Promega, France) at 20 ng/ μ l as previously described (Shevchenko et al. Anal Chem 1996). The dried peptide extracts obtained were dissolved in 17 μ l of 0.05% trifluoroacetic acid in 2% acetonitrile and analysed by online nanoLC using an UltiMate® 3000 RSLCnano LC system (Thermo Scientific Dionex) coupled to an ETD enabled Orbitrap Fusion™ Tribrid™ mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) for an alternative decision tree-driven collision-induced dissociation (CID) / electron transfer dissociation (ETD) fragmentation acquisition (Swaney et al. Nat Methods 2008) as previously described (Jungas et al. J Cell Biol. 2016).

Expression, Purification of GST Fusion Proteins, and GST Pull-Down

Overnight cultures of E. coli transformed with parental or recombinant pGEX plasmids were diluted 1:10 in L-broth with 50 μ g/ml ampicillin and incubated at 37 °C with shaking to an A₆₀₀ of 0.5. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside was then added to a final concentration of 0.1 mM. After a further 3–5 h of growth, cells were pelleted at 5000 \times g for 10 min at 4 °C and

resuspended in NETN buffer (0.5% Nonidet P-40, 1 mm EDTA, 20 mm Tris, pH 8, 100 mm NaCl) containing proteases inhibitors cocktail (Roche). Cells were then sonicated and centrifuged at 10,000 ×g for 5 min at 4 °C. GST fusion proteins, preloaded on glutathione-coupled beads, were incubated overnight at 4 °C with 0.06 µg of commercial purified human His-PKCθ (Millipore). After three washes with NETN, denatured samples were analyzed by western blot using PKCθ antibody.

***In vitro* PKCθ Kinase Assay**

GST fusion proteins, preloaded on glutathione-coupled beads, were washed with NETN buffer twice and kinase buffer twice (50 mm Tris-HCl (pH 7.5), 5 0.5 mm EDTA, 0.5 mm EGTA, 2 mm MgCl₂). Subsequently, GST fusion proteins bound to the beads were resuspended in reaction buffer (20 mm Tris-HCl (pH 7.5), 10 mm MgCl₂, 10 µm cold ATP, 2.5 µl of lipid activator (Millipore), 2.5 µCi of [γ -³²P]ATP (6,000 Ci/mmol)) and were incubated with 0.3 µg of commercial active human His-PKCθ (Millipore) at 30 °C for 10 min. The reactions were terminated by the addition of protein loading buffer. Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel, and the gel was subjected to autoradiography.

Animal studies and Bioluminescence imaging

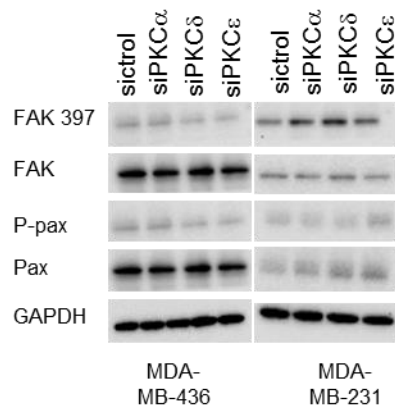
All animal work was done in accordance with a protocol approved by the Institutional Animal Care and User Ethical Committee of the UMS006 and Région Midi-Pyrénées. Female BALB/c nude mice 4–6 weeks old (Charles River Laboratory) were used for the experimental lung metastasis assay. MDA-MB-231-LM2-4175 cells (10⁶ viable cells) were washed and harvested in PBS and subsequently injected into the lateral tail vein in a volume of 0.2 ml. For bioluminescence imaging, mice were anesthetized and injected intra-peritoneally with 1.5 mg of D-luciferin (15 mg/ml in PBS). Imaging was completed between 2 and 5 min after injection with the IVIS Spectrum system.

Modeling of the FAK-PKCθ complex

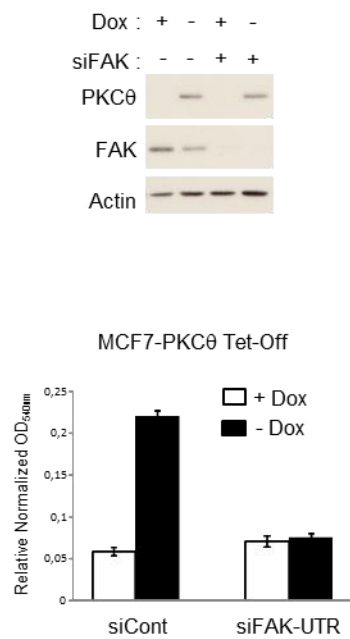
Molecular modeling of the FAK-PKC θ complex has been attempted in order to gain a better understanding of the details of the interaction between the two molecules. The partial structure of FAK, containing the FERM and Kinase domains, is known from crystallographic studies (Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D.F.J., Li, Y., Schaller, M.D., Eck, M.J., Cell (2007) 129 p.1177-1187, PDB entries 2J0J and 2J0K). The structure of the FAT domain is also known, but not its position relative to the other two domains, because it appears at the end of a long and unstructured linker. Since it has been shown that this domain does not participate in the binding between FAK and PKC θ (see Fig. 5d), it has been left out from modeling. The stability of the structure composed of the FERM and Kinase domains has been confirmed by a 1 μ s run of a coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulation (for details see the supplementary material). The PKC θ molecule consists of the C2, C1, V3 and Kinase domains, whose structures have been determined experimentally separately, except the one for V3 (PDB codes: 2ENJ (C2), 2ENN (C1a), 2ENZ (C1b), 4FKD (C1b), 1XJD (Kinase), 5F9E (Kinase), 2JED (Kinase)). The Protein Model Portal (<http://www.proteinmodelportal.org>) database contains models of the V3 domain obtained by homology with PDB entries 4AW2, 5DYK and 1XA6 as templates. Our attempts at finding best relative orientations of individual PKC θ domains with respect to the FAK molecule have been unsuccessful because the docking results were not in agreement with the experimental observations. Consequently, we have created a complete PKC θ molecule by adding interdomain linkers and performed a series of 2 μ s CG-MD simulations in order to allow the molecule to relax and adopt the optimal structure in solution. The structures of individual domains did not change perceptibly, but their relative orientations did due to the changes in conformations of linkers. The structure with the lowest energy has been retained as a starting point for the modeling of the FAK-PKC θ complex. Since we know that interactions between the two molecules involve the FERM domain (specifically the F1 and F2 subdomains) of FAK and the regulatory domain

(C2, C1 and V3) of PKC θ , we have created several complex structures where domains implicated in interactions were close to each other, in different relative orientations. This was made possible by rendering the linkers flexible. Next, a series of 200 ns all-atom (AA) MD simulations (details in the supplementary material) have been performed to assess the stability and evolution of the systems. In most cases the initial placement of domains changed significantly, leading to structures with unwanted domain interactions. One of the models, however, was stable over the time of simulation and showed satisfactory agreement with experimental data. It is depicted in Fig. 5h. The structure of the complex from the last frame of the MD simulation is available in the supplementary material. In spite of the fact that the model of the complex shows full atomic details of the structure, it is an approximation which requires experimental validation. We are planning to perform a crystallographic study of the FAK-PKC θ complex in near future.

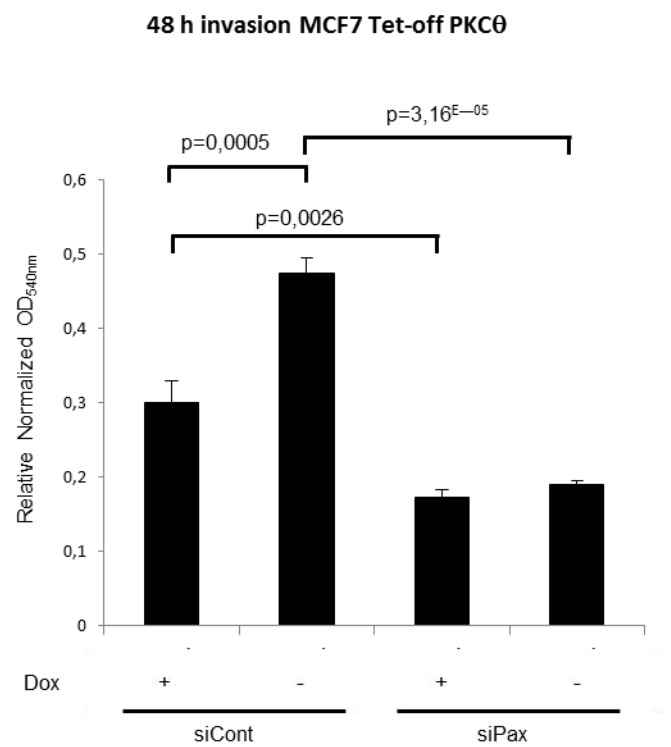
a



b

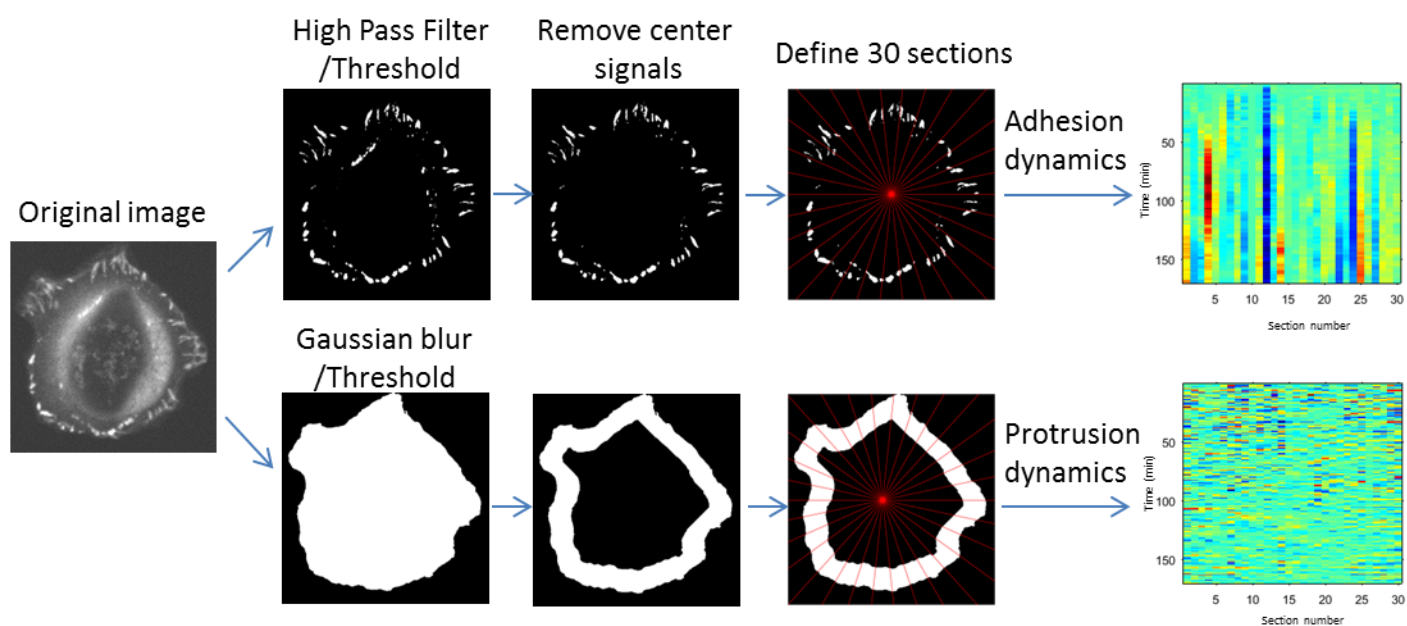


c

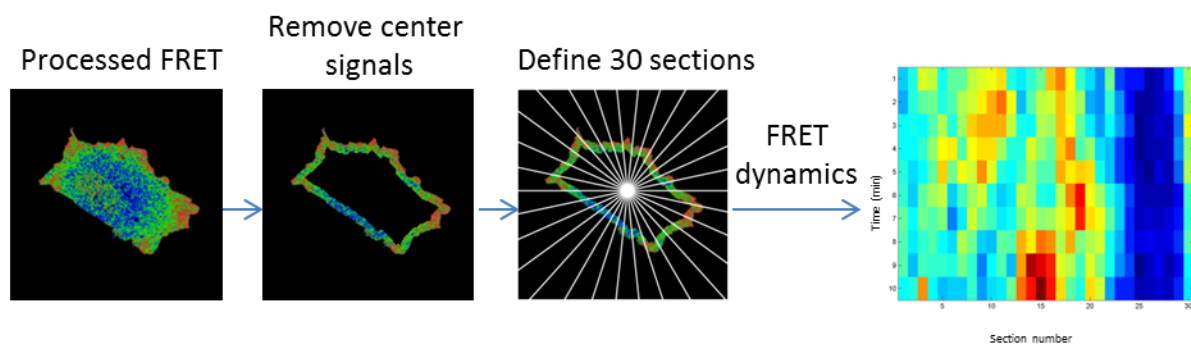


Suppl. Figure 1

a

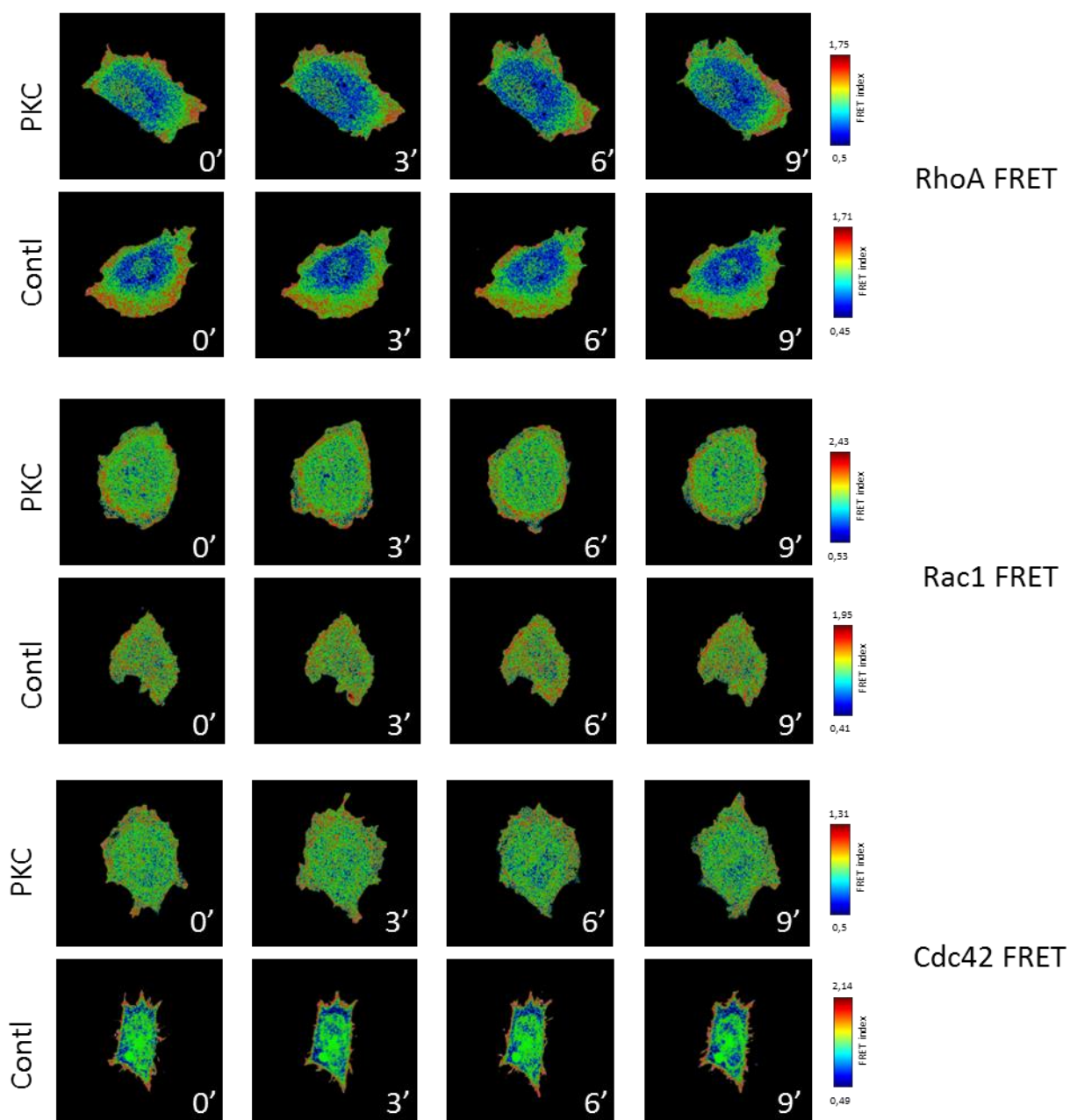


b

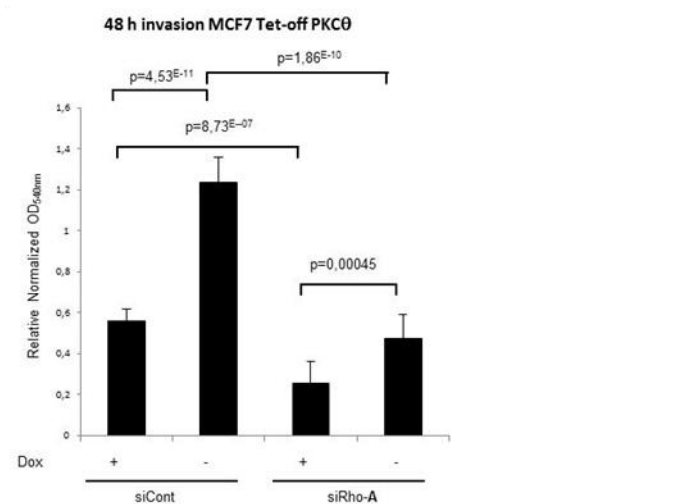


Suppl. Figure 2

a

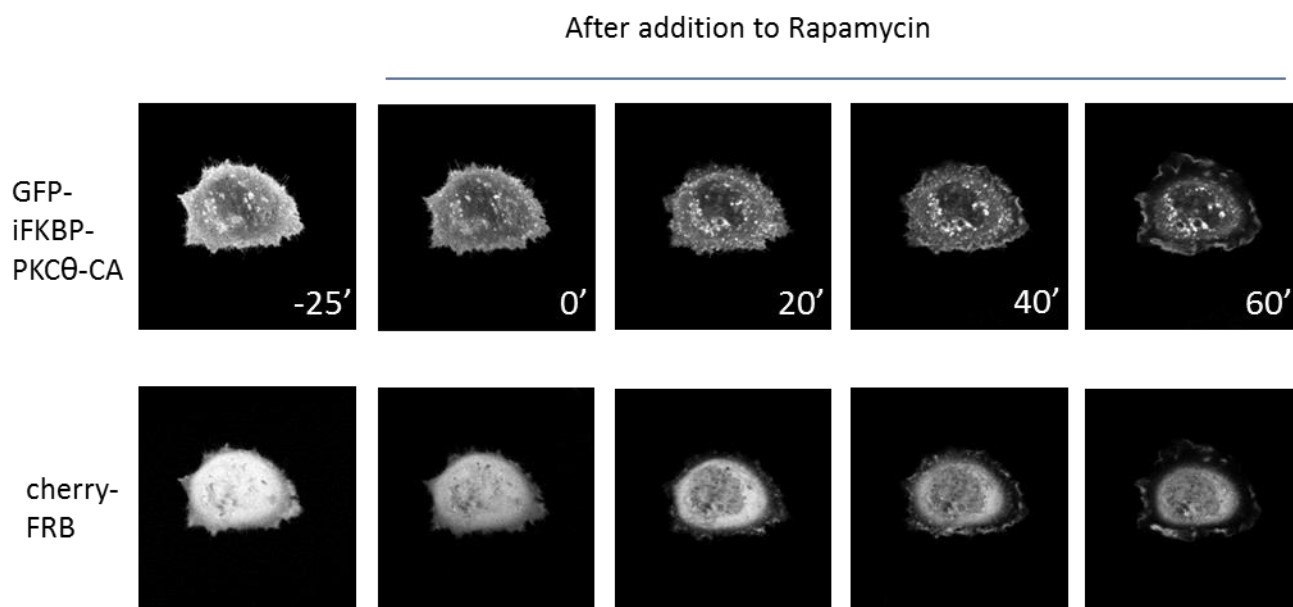


b

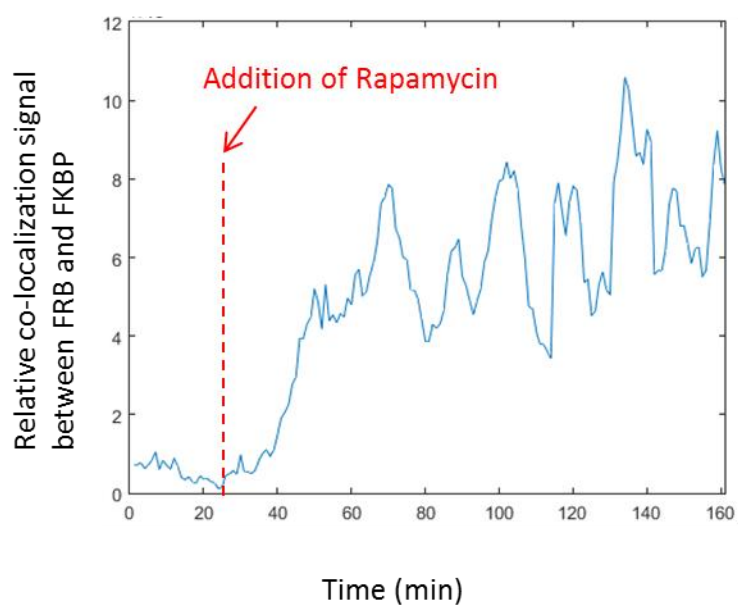


Suppl. Figure 3

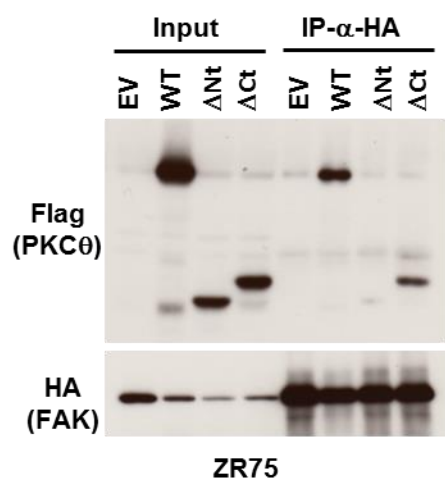
a



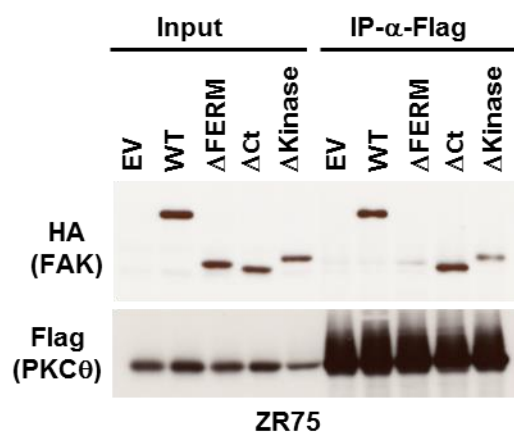
b



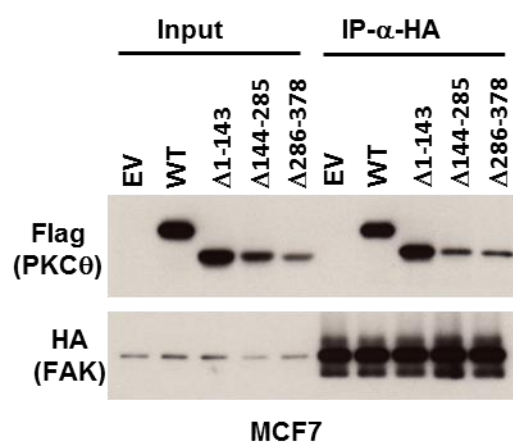
a



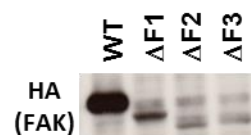
b



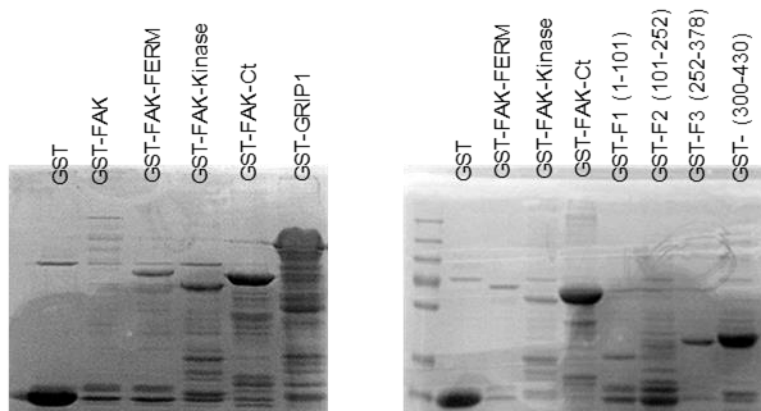
c

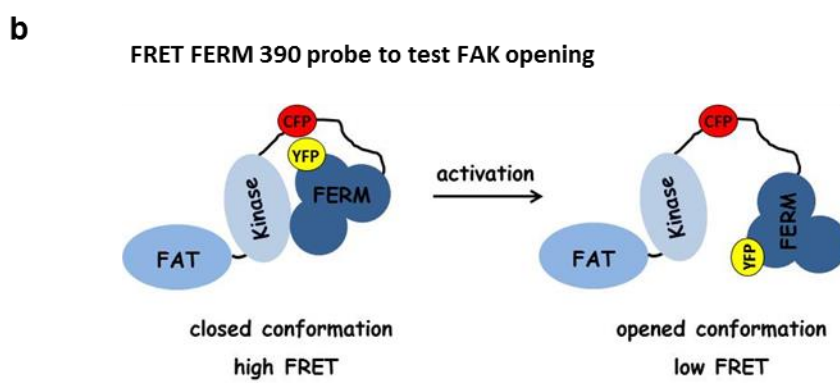
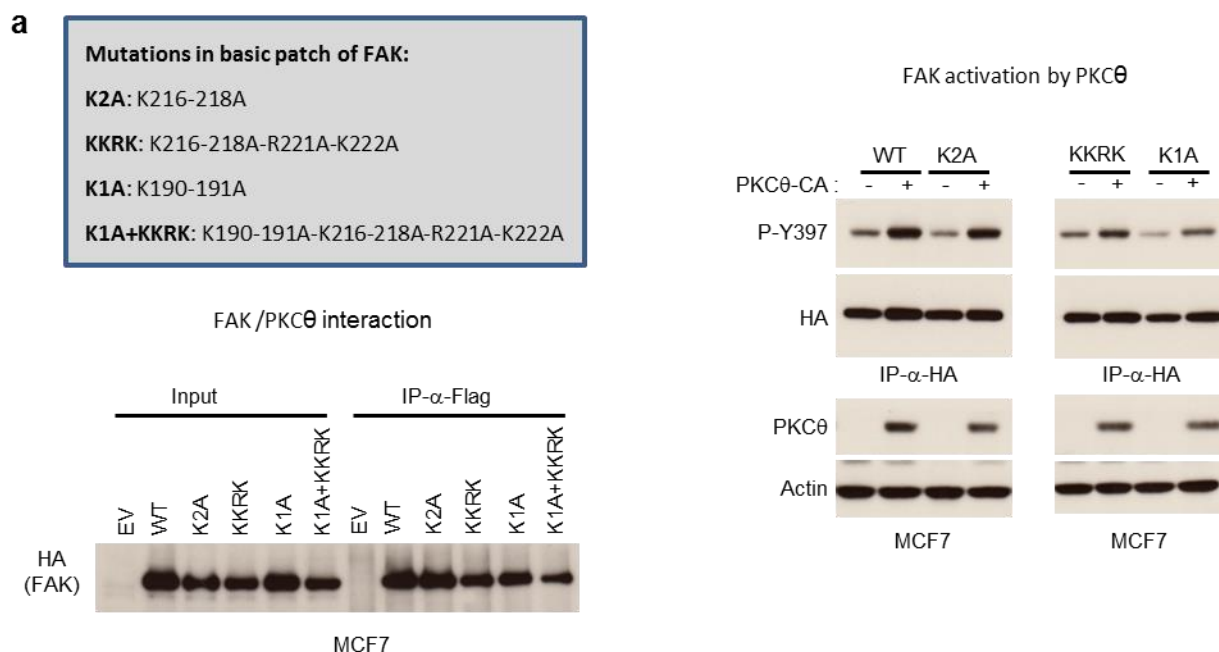


d



e





c

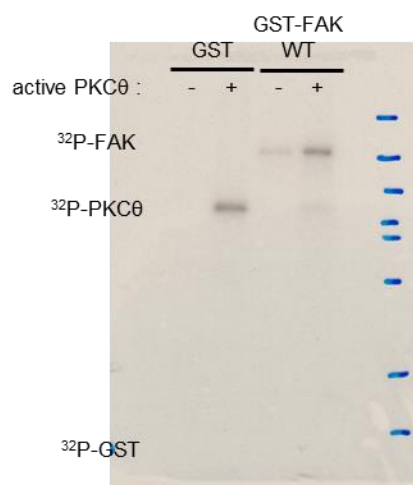
Summary about Co-IP experiments with various PKCθeta and FAK truncated mutants required for modeling

Overall, the F2 domain of FAK interacts more strongly than the F1 domain with the PKCθeta protein no matter if PKCθeta is whole or deleted from the 1-143 (C2) domain, or 144-285 (C1), or 286-375 (V3). The domain F3 interacts very very weakly with whole PKCθeta or deleted with the different domains.

More precisely, the F1 domain no longer interacts with the PKCθeta protein deleted from the domain 1-143 (C2), and its interaction with PKCθeta deleted from the domain 144-285 (C1), or 286-375 (V3) is lower than its interaction with PKCθeta whole.

On the other hand, the F2 domain interacts much more strongly with the PKCθeta protein deleted from the 286-375 domain (V3) than with the entire PKCθeta protein, and its interaction with PKCθeta deleted from domain 1-143 (C2) or 144-285 (C1) is slightly stronger than its interaction with whole PKCθeta.

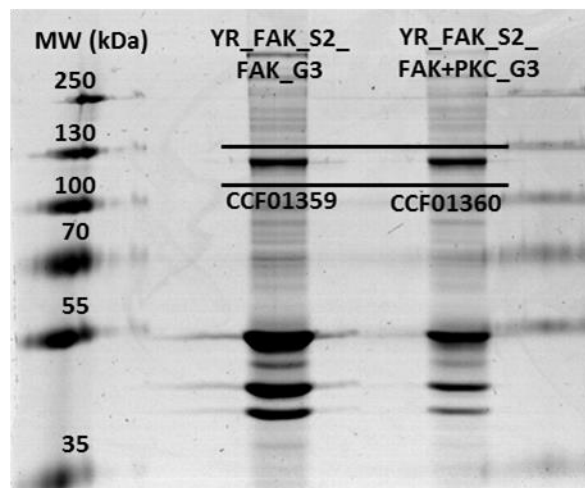
a



b

FAK: mass spectrometry analysis

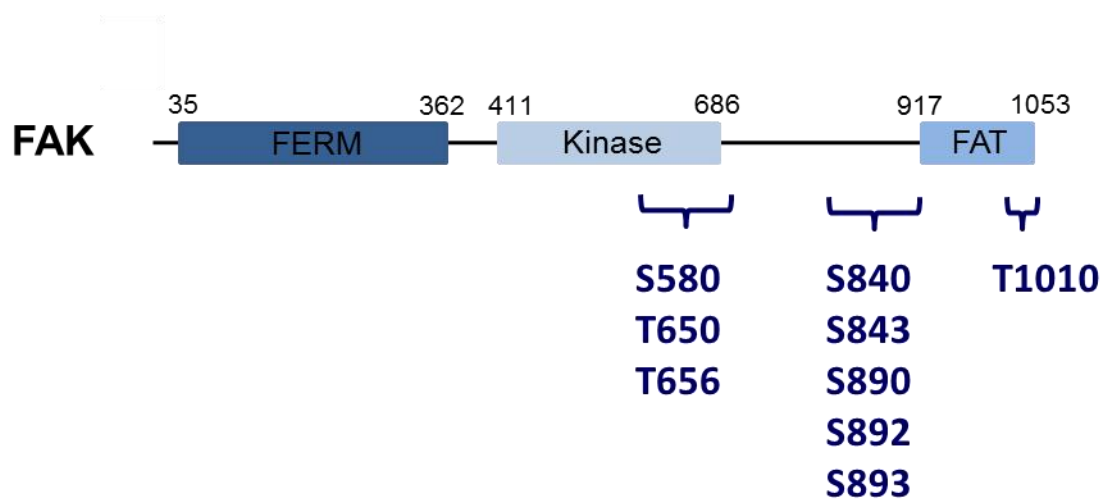
Dox: + -



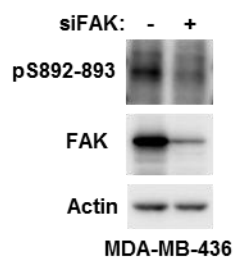
IP-αFAK

MCF7-PKCθ-CA Tet-Off

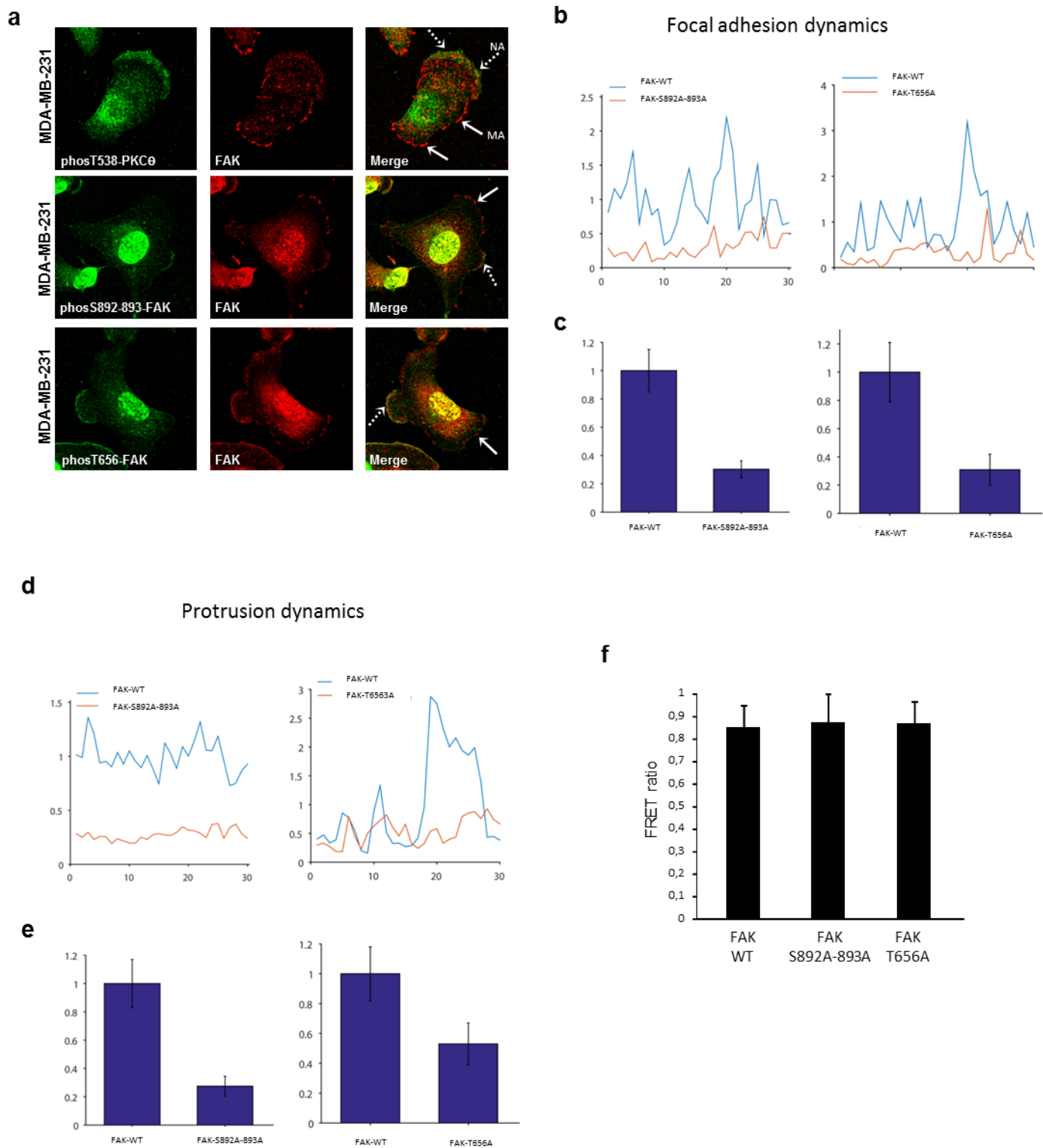
c



d



Suppl. Figure 7



Suppl. Figure 8

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Suppl. Figure 1. a. The indicated TNBC cell lines were transfected with siRNAs (3.6 nM) targeting either *PRKCA* or *PRKCE* or *PRKCD* gene. After 48h-transfections, WCEs were subjected to immunoblotting analysis. **b, c.** MCF7 cells stably expressing active PKC θ (PKC θ -CA) under tetracycline control (MCF7-PKC θ -CA Tet-Off) were transfected with 3.6 nM of siRNA targeting the 5'UTR region of *FAK* gene (**b**) or the *PXN* gene (**c**) in the presence (+) or absence (–) of doxycycline (Dox). Two days later, cells were either plated in 12-well plates for immunoblotting analysis or subjected, in triplicate, to an invasion assay for 48 h.

Suppl. Figure 2. a. Schematic representation of the method used to quantify the focal adhesion and protrusions dynamics. **b.** Schematic representation of the method used to quantify the small GTPases FRET dynamics.

Suppl. Figure 3. a. Time lapse series of representative processed FRET signal in the indicated MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell: (**bottom**) MCF7-cont: +Dox and (**top**) MCF7-PKC θ -CA: -Dox, expressing different smallGTPases biosensors (RhoA, Rac1, cdc42). RGB color bars have been used to label the range of the FRET signal. **b.** MCF7 cells stably expressing active PKC θ (PKC θ -CA) under tetracycline control (MCF7-PKC θ -CA Tet-Off) were transfected with 3.6 nM of siRNA targeting the *RHOA* gene in the presence (+) or absence (–) of doxycycline (Dox). Two days later, cells were either plated in 12-well plates for immunoblotting analysis or subjected, in triplicate, to an invasion assay for 48 h.

Suppl. Figure 4. a. Time lapse series of representative PKC θ iFKBP-CA-GFP and cherry-FRB signals in MCF7 cells before and after addition of 200 nM rapamycin. **b.** Quantification of the colocalization signal of cherry-FRB with PKC θ iFKBP-CA-GFP upon treatment with rapamycin.

Suppl. Figure 5. a. ZR75.1 cells were co-transfected with HA-FAK wt and either Flag-PKC θ wt (full length) or Flag-PKC θ - Δ Nt (aa 379-706) or Flag-PKC θ - Δ Ct (aa 1-378) or empty vector (EV). Two days later, WCEs were immunoprecipitated with an anti-HA antibody, and immunoblotted with anti-HA and anti-Flag antibodies. The input corresponds to 4% of WCEs used in immunoprecipitation. **b.** ZR75.1 cells were co-transfected with Flag-PKC θ wt and either HA-FAK wt (full length) or HA-FAK- Δ Kinase (aa 1-370/701-1052) or HA-FAK- Δ Ct (aa 1-701). Two days later, WCEs were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody, and immunoblotted with anti-Flag and anti-HA antibodies. The input corresponds to 4% of WCEs used in immunoprecipitation. **c.** MCF7 cells were co-transfected with HA-FAK wt and either Flag-PKC θ wt (full length) or Flag-PKC θ - Δ C2 (aa 145-706) or Flag-PKC θ - Δ C1 (aa 1-143/287-706) or Flag-PKC θ - Δ V3 (aa 1-285/378-706) or empty vector (EV). Two days later, WCEs were immunoprecipitated with an anti-HA antibody, and immunoblotted with anti-HA and anti-Flag antibodies. The input corresponds to 4% of WCEs used in immunoprecipitation. **d.** WCEs from MCF7 transfected either HA-FAK wt (full length) or HA-FAK- Δ F1 (aa 102-1052) or HA-FAK- Δ F2 (aa 1-101/253-1052) or HA-FAK- Δ F2 (aa 1-252/379-1052) were immunoblotted with anti-HA antibody. **e.** Coomassie staining of the various GST fusion proteins that were used in Figure 5e.

Suppl. Figure 6. a. (left panel) MCF7 cells were co-transfected with Flag-PKC θ wt and either HA-FAK wt or various HA-FAK mutants. Two days later, WCEs were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody, and immunoblotted with anti-HA antibody. The input corresponds to 4% of WCEs used in immunoprecipitation **(right panel)** MCF7 cells were co-transfected with HA-FAK wt or various HA-FAK mutants in the presence (+) or absence (-) of PKC θ -CA expression vector. The activation of immunoprecipitated FAK variants was tested by immunoblotting using antibodies against pY397-FAK,. The presence of PKC θ and the equal amount of immunoprecipitated FAK variants were detected using

antibodies against PKC θ and HA, respectively. **b.** Schematic representation of the FAK conformational biosensor design: YFP was inserted at the N-terminus of FAK and CFP was inserted between the FERM and the kinase domains after the amino acid 390. **c.** Summary about Co-IP experiments with various PKC θ and FAK truncated mutants required for modeling.

Suppl. Figure 7. a. Commercial recombinant GST or GST-FAK wt fusion proteins were used as substrate in *in vitro* kinase assay in the absence (–) or presence of recombinant active His-PKC θ . Phospho-FAK (32 P-FAK) was detected by autoradiography. **b.** Coomassie staining of the FAK protein that was immunoprecipitated from either MCF7-cont (with dox) + FAK WCEs or MCF7-PKC θ -CA (without dox) + FAK WCEs. The band corresponding to FAK protein (marked between two black lines) were cut and analysed by mass spectrometry for the identification of phosphorylation sites. **c.** Schematic representation of FAK structure showing in blue the localization of the potential PKC θ phosphorylation sites identified by mass spectrometry analysis. **d.** The indicated TNBC cell lines were transfected with siRNA (3.6 nM) targeting the *FAK* gene. After 48h-transfections, WCEs were subjected to immunoblotting analysis using antibodies against pS892-893-FAK, pT656-FAK, FAK and PKC θ . Anti-Actin and anti-GAPDH antibodies were used to confirm equal loading.

Suppl. Figure 8. a. Serum-starved MDA-MB-231 cells were stimulated by serum for 5h and then were fixed and stained with antibodies against pT538-PKC θ , pS892-893-FAK, pT656-FAK and FAK. Full white arrows indicate the mature adhesion (MA) and discontinue white arrows indicate the nascent adhesion (NA). **b.** Quantification of relative focal adhesion dynamic variation in one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin and siFAK-5'UTR together with FAK WT or FAK S892-893A or FAK T565A. **c.** Quantification of the relative percentage of the focal adhesion dynamic variation from the

indicated MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells. n is the number of samples analysed (more than 5). All error bars indicate \pm s.d., $P < 0.001$ means significant difference by student's t -test. **d.** Quantification of relative protrusion dynamic variation in one representative MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cell expressing GFP-paxillin and siFAK-5'UTR together with FAK WT or FAK S892-893A or FAK T565A. **e.** Quantification of the relative percentage of the protrusion dynamic variation from the indicated MCF7-PKC θ -CA Tet-Off cells. n is the number of samples analysed (more than 5). All error bars indicate \pm s.d., $P < 0.001$ means significant difference by student's t -test. **f.** Quantification of the average FAK conformational biosensor FRET ratio from MCF7 cells co-transfected with PKC θ WT and either WT FAK conformational biosensor or FAK conformational biosensor carrying the S892-893A or T656A mutations. The number of the analyzed cells at each condition is 12.

Chapitre VI

Étude du contrôle de PKC θ par CDCP1 dans les cancers du sein triple-négatifs.

Dans l'étude présentée dans le chapitre IV, nous identifions pour la première fois une cible directe de PKC θ dans le cancer du sein : PKC θ phosphoryle directement FAK sur des sites nouvellement identifiés. Ce contrôle suppose une activation de la fonction catalytique de PKC θ . Aussi, il n'est pas surprenant de constater que PKC θ est fortement activée dans les cellules CSTN (Belguise et al., 2012). Par conséquent, la question que nous nous sommes posés par la suite est la suivante : **comment PKC θ est-elle activée dans les cancers du sein triple-négatifs ?** Répondre à cette question pourrait permettre à la fois de mieux comprendre la régulation de PKC θ mais aussi de replacer PKC θ en fonction des intégrines et des récepteurs aux facteurs de croissances en aval desquels FAK est activée (Mitra et al., 2006).

Dans cet objectif, nous nous sommes intéressés au rôle de CDCP1 dans l'activation de PKC θ .

Cette étude a été menée durant ma dernière année de thèse. Je présenterai les données préliminaires obtenues dans la partie résultats et je discuterai dans la conclusion de ce chapitre des expériences qu'il reste à réaliser pour mieux répondre à cette question.

6.1. Introduction

CDCP1 (CUB domain-containing protein-1) est une glycoprotéine de surface de 836 acides aminés également connue sous le nom de SIMA135 (subtractive immunization associated 135 kDa), Trask ou gp140. Elle comprend un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire de 636, 21 et 150AA respectivement (Wortmann et al., 2011). Le domaine extracellulaire contient plusieurs sites consensus de N-glycosylation. Sa taille apparente en western blot est de 135 kDa. La partie extracellulaire de CDCP1 peut être clivée par des protéases générant une protéine de 70-85 kDa, clivage pouvant être induit par la trypsine (Wortmann et al. 2011).

CDCP1 est fortement exprimée (ARNm et protéine) par les cellules tumorales de différents cancers tels que les mélanomes, les cancers du poumon, du pancréas, du rein, du côlon, de la prostate, de l'endomètre, de l'œsophage et du sein (Uekita et Sakai, 2011). Dans le cas des cancers du poumons, du pancréas et du côlon, une forte expression de CDCP1 est associée à de mauvais pronostics à l'inverse des cancers de l'endomètre et de l'œsophage pour lesquels une forte expression de CDCP1 est associée à des pronostics favorables (Turdo et al., 2016). De façon intéressante, il a été constaté par immunohistochimie de tumeurs rénales qu'une localisation membranaire de CDCP1 est associée à un plus mauvais pronostic en comparaison à une localisation cytoplasmique de CDCP1 (Razorenova et al., 2011).

Concernant le cancer du sein, il a été montré récemment que CDCP1 est fortement exprimé dans les CSTN au niveau ARNm et protéique (Wright et al., 2016 ; Turdo et al. 2016). De plus une forte expression de CDCP1 est associée à une plus forte probabilité de formation de métastases et donc à de mauvais pronostics (Turdo et al., 2016). Cet effet de CDCP1 sur l'agressivité des CSTN de patientes peut s'expliquer par les effets de CDCP1 sur des lignées de cancers du sein CSTN: l'inhibition de CDCP1 par ARNi dans différentes lignées CSTN aboutit à une diminution de leurs capacités migratoires et invasives (Turdo et al., 2016, Wright et al., 2016). Wright et al. montrent que la dimérisation et le clivage de CDCP1 sont impliqués dans ce contrôle de la migration des cellules CSTN (Wright et al., 2016). Ces résultats rejoignent ceux de Casar et al. qui montrent que le clivage de CDCP1 est nécessaire à la formation de métastases *in vivo* dans un modèle murin orthotopique de cancer de la prostate (Casar et al., 2014). Casar et al. montrent également que suite à son clivage, CDCP1 est capable d'induire l'activation de FAK (pY397). Cependant, les auteurs n'ont pas réellement exploré le lien entre CDCP1 et l'activation de FAK (Casar et al., 2014). Nous supposons que PKC θ pourrait constituer ce lien.

Cette hypothèse s'appuie sur une étude *in vitro* qui montre que l'interaction du domaine C2 de PKC θ avec un fragment tyrosine phosphorylé dérivé de CDCP1 aboutit à l'activation de la fonction catalytique de PKC θ et ce, même en l'absence de DAG (Stahelin et al., 2012).

Ainsi, les résultats de cette étude associés au fait que CDCP1 est fortement exprimé dans les CSTN dans lesquels elle joue des fonctions similaires à PKC θ permettent de considérer

CDCP1 comme un excellent candidat à tester pour explorer l'activation de PKC θ dans les cancers du sein triple-négatifs.

6.2 Résultats.

6.2.1. CDCP1 est essentiel aux effets de PKC θ sur l'invasion de cellules de cancer du sein.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'importance de CDCP1 sur les effets positifs de PKC θ sur l'invasion de cellules de cancers du sein. Pour cela, nous avons mené deux tests d'invasions par triplicats en utilisant indépendamment deux ARNi différents dirigés contre CDCP1. Nous observons que les effets positifs de la surexpression d'une PKC θ constitutivement active sur l'invasion de MCF7 (ER+) sont complètement abolis par l'inhibition de CDCP1. Ainsi, CDCP1 est essentiel aux effets de PKC θ sur l'invasion (**Figure 23**).

6.2.2. CDCP1 contrôle positivement l'activité de PKC θ sur FAK.

Dans un deuxième temps, nous sommes revenus aux lignées de cancer du sein triple-négatifs qui expriment PKC θ de façon physiologique.

Nous observons que l'inhibition de CDCP1 dans les MDA-MB-436 aboutit à une diminution du niveau de PKC θ phosphorylée sur la T538 (**Figure 25**), phosphorylation ayant été décrite comme essentielle à son activité catalytique (Liu et al., 2002). De façon intéressante, l'inhibition de CDCP1 diminue fortement les phosphorylations 892-893 sur FAK, identifiées dans l'étude précédente comme étant spécifiques à PKC θ et jouant un rôle majeur sur les effets de PKC θ sur l'invasion (**Figure 24**).

Ainsi, dans ces lignées, CDCP1 semble contrôler positivement l'activité catalytique de PKC θ .

Par la suite, nous avons voulu comprendre comment CDCP1 est capable d'affecter l'activité de PKC θ et ses effets sur l'invasion.

6.2.3. CDCP1 interagit avec PKC θ et est localisé au front de cellules en migration.

Stahelin et al. ayant montré que PKC θ interagit avec un fragment de CDCP1 *in vitro*, nous avons testé l'interaction entre CDCP1 et PKC θ dans des cellules CSTN MDA-MB-436. Nous observons que les deux protéines interagissent. De façon intéressante, il semble que PKC θ interagit uniquement avec la forme non clivée de CDCP1 (**Figure 26, A**).

Cette interaction pourrait avoir lieu au front de cellules en migration puisque nous observons sur des MDA-MB-231 que le signal de CDCP1 tout comme celui de PKC θ est enrichi au front de migration lors d'une expérience de comblement de blessure (**Figure 26, B**). Ainsi, ces résultats suggèrent que CDCP1 pourrait activer PKC θ au front des cellules en migration.

Cependant, nous avons vu que dans les clones MCF7-Tetoff-PKC θ , dans lesquelles nous surexprimons une PKC θ constitutivement active, CDCP1 est également essentiel aux effets de PKC θ sur l'invasion. Or dans ce cas-là, PKC θ est déjà active et l'inhibition de CDCP1 ne limite pas la phosphorylation T538 (**Figure 23**). Par conséquent, dans ce cas, les effets de CDCP1 ne passent pas par un contrôle de l'activité catalytique de PKC θ et nous avons supposé qu'elle pourrait agir sur l'interaction endogène de PKC θ avec FAK. Pour tester cette hypothèse, nous avons inhibé CDCP1 par ARNi dans des MDA-MB-436 et mené une expérience de co-immunoprécipitation. L'inhibition de CDCP1 n'affecte pas le niveau d'interaction PKC θ /FAK (**Figure 27**).

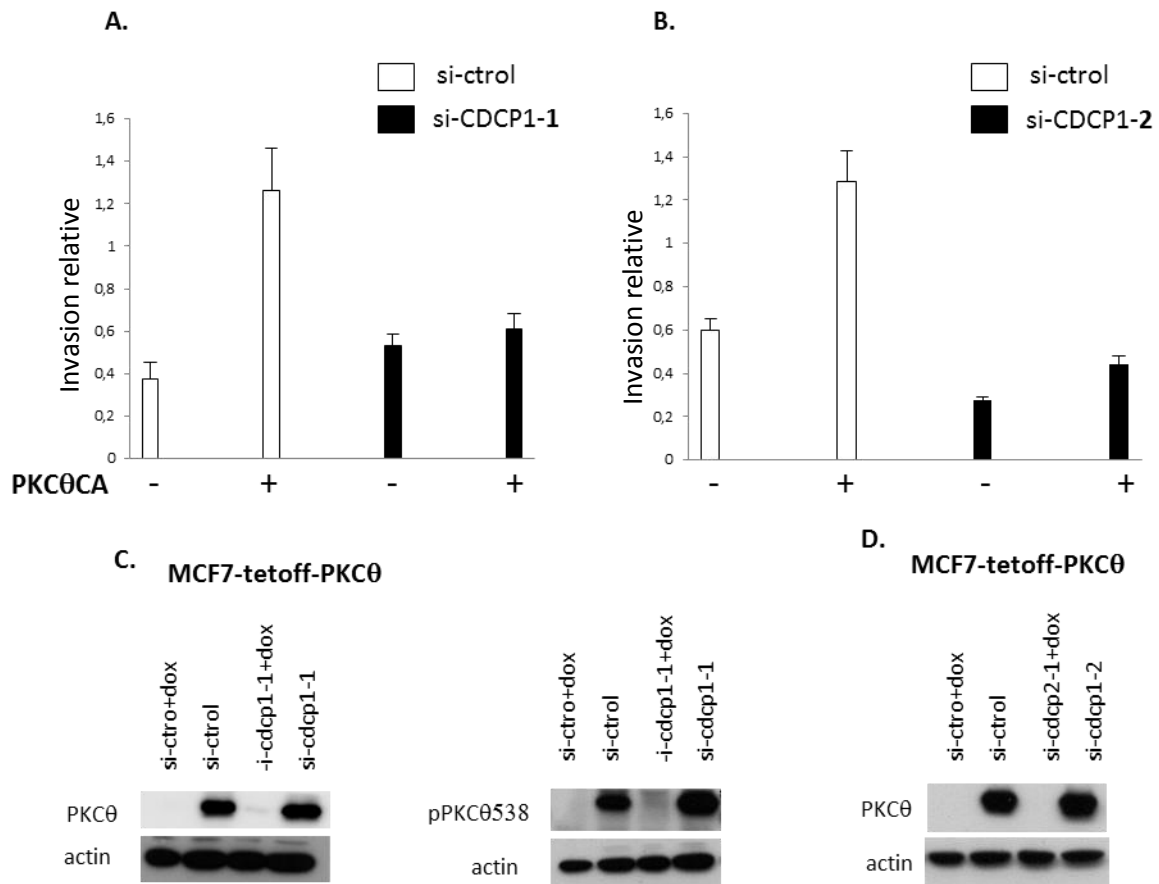


Figure 23. Les effets de PKCθ sur l'invasion dépendent entièrement de CDCP1. CDCP1 est inhibé par transfection d'ARNi (siCDCP1-1 (séquence GCTCTGCCACGAGAAAGCAACATTA) pour le graphe **A** et si CDCP1-2 (TCAGCATTGCAAACGCTCATCTAT), pour graphe **B**) dans des cellules exprimant PKCθ constitutivement active de façon inductible (MCF7-tetoff-PKCθ) sous le contrôle de la doxycycline. 48h après transfection et traitement ou non à la doxycycline, un test d'invasion est lancé sur chambre de boyden recouverte de 100μl de Matrigel à 300μg/ml. Les cellules ayant envahi sont comptées au MTT 48h plus tard et l'invasion relative est calculée en rapportant la valeur d'invasion à la valeur de prolifération, évaluée pour chacune des conditions par ensemencement de cellules sur des puits en parallèle. L'expression de PKCθ n'est pas affectée par l'inhibition de CDCP1 (**C** pour l'essai avec le siRNA CDCP1-1 et **D** pour le siRNA CDCP1-2). L'inhibition de CDCP1 ne diminue pas le niveau d'activation de PKCθ signé par la phosphorylation sur T538 (**C**, western blot de droite).

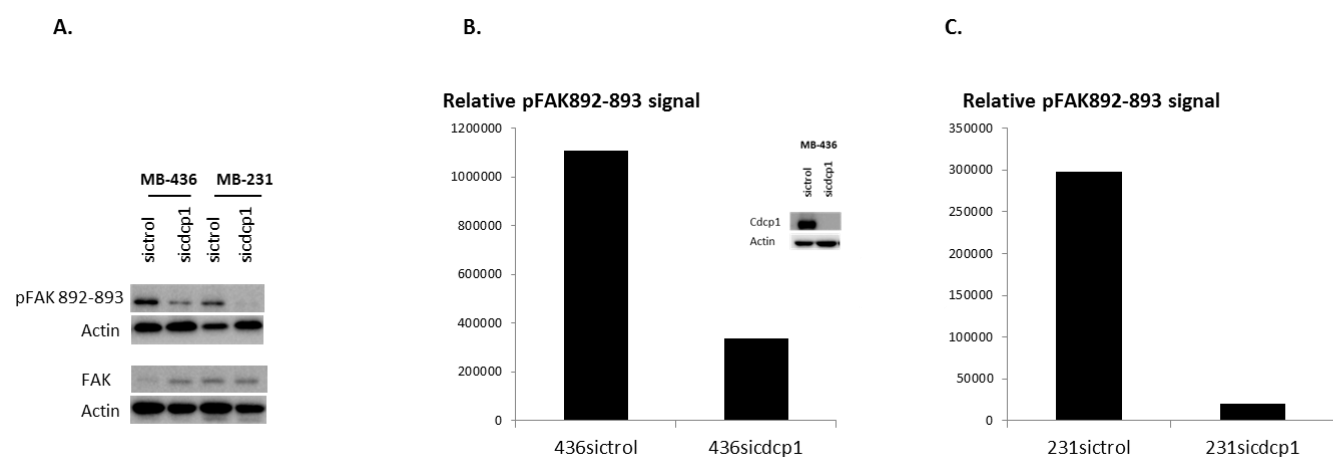


Figure 24. Une inhibition de CDCP1 diminue fortement la phosphorylation sur FAK 892-893. CDCP1 est inhibé par transfection d'ARNi (siCDCP1-1) dans des lignées triple-négatives MDA-MB-436 ou MDA-MB-231. 48h après transfection, les cellules sont lysées et 25µg de protéines totales sont chargées sur western blot pour analyse (A). Les signaux sont quantifiés avec le logiciel BIORAD Image Lab, et le signal relatif de phosphorylation de FAK sur 892-893 est calculé en rapportant chacun des signaux au signal d'actine correspondant et au signal de FAK total pour la lignée MDA-MB-436 (B) et MDA-MB-231 (C)

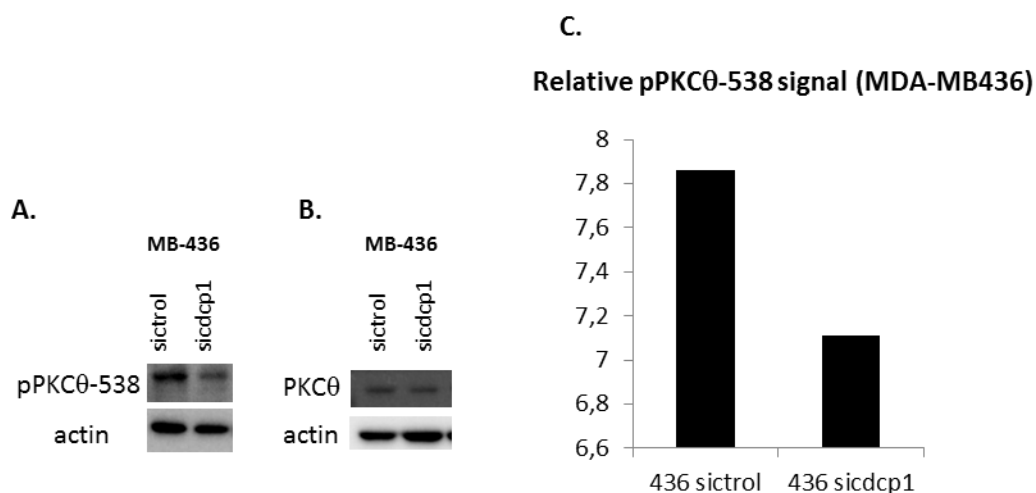


Figure 25. Une inhibition de CDCP1 diminue fortement l'activation de PKCθ. CDCP1 est inhibé par transfection d'ARNi (siCDCP1-1) dans des lignées triple-négatives MDA-MB-436 ou MDA-MB-231. 48h après transfection, les cellules sont lysées et 25µg de protéines totales sont chargées sur western blot pour analyse (A et B). Les signaux sont quantifiés avec le logiciel BIORAD Image Lab, et le signal relatif de phosphorylation de pPKCθ-538 est calculé en rapportant chacun des signaux au signal d'actine correspondant (C.)

6.3. Conclusion et perspectives.

Les résultats obtenus ici suggèrent fortement que CDCP1 est essentiel aux effets de la surexpression de PKC θ sur l'invasion de lignées de cancer du sein MCF7. De plus, ils nous permettent de supposer que cet effet pourrait passer par une inhibition des effets de PKC θ sur FAK, puisque nous constatons dans deux lignées CSTN que l'inhibition de CDCP1 diminue fortement les phosphorylations 892-893 de FAK qui sont spécifiquement induites par PKC θ et qui, comme nous l'avons montré dans l'étude précédente, sont majeures dans son contrôle de l'invasion. Pour confirmer que, dans les cellules MCF7, de la même façon, les effets d'une inhibition de CDCP1 sur l'invasion contrôlée par PKC θ sont bien liés à une inhibition de ses effets sur FAK comme observé dans des lignées de cellules CSTN, nous sommes en train d'évaluer l'impact d'une inhibition de CDCP1 sur les effets de PKC θ sur FAK (p892-893) et sur la voie FAK en aval (p-Paxilline et p-Src).

Les données obtenues nous permettent aussi d'appréhender la façon par laquelle CDCP1 contrôle PKC θ . Dans des cellules CSTN, nous constatons que l'inhibition de CDCP1 diminue la phosphorylation sur T538 de PKC θ signant l'activation catalytique de PKC θ (Liu et al., 2002). De plus, nous constatons que CDCP1 et PKC θ interagissent dans ces cellules. L'étude menée par Stahelin et al., en 2012 qui montre que PKC θ est capable d'interagir *in vitro* avec un fragment de CDCP1 nous laisse supposer que cette interaction est directe. De plus, leurs résultats suggèrent que cette interaction permet de lever une autoinhibition médiée par le domaine C2 de PKC θ permettant ainsi l'activation de sa fonction catalytique (Stahelin et al., 2012) ce qui nous permet de supposer que l'interaction que nous observons est à l'origine des effets de CDCP1 sur l'activation de PKC θ dans nos cellules. Pour corroborer cette hypothèse, nous comptons tester l'interaction de PKC θ et CDCP1 (total et non seulement un fragment comme dans l'étude de Stahelin et al.) *in vitro* par GST pull down, ce qui pourra nous indiquer si ces deux protéines peuvent interagir directement. De plus, nous pourrions voir si l'interaction que nous observons a lieu via le domaine C2 de PKC θ , décrit par Stahelin et al comme impliqué dans l'interaction permettant l'activation de PKC θ par le fragment de CDCP1. Nous utiliserons un mutant PKC θ de délétion du domaine C2 (déjà construit) que

nous testerons par co-immunoprécipitation et GST pull down. A l'inverse, nous pourrions construire et tester un mutant CDCP1 délété du fragment utilisé.

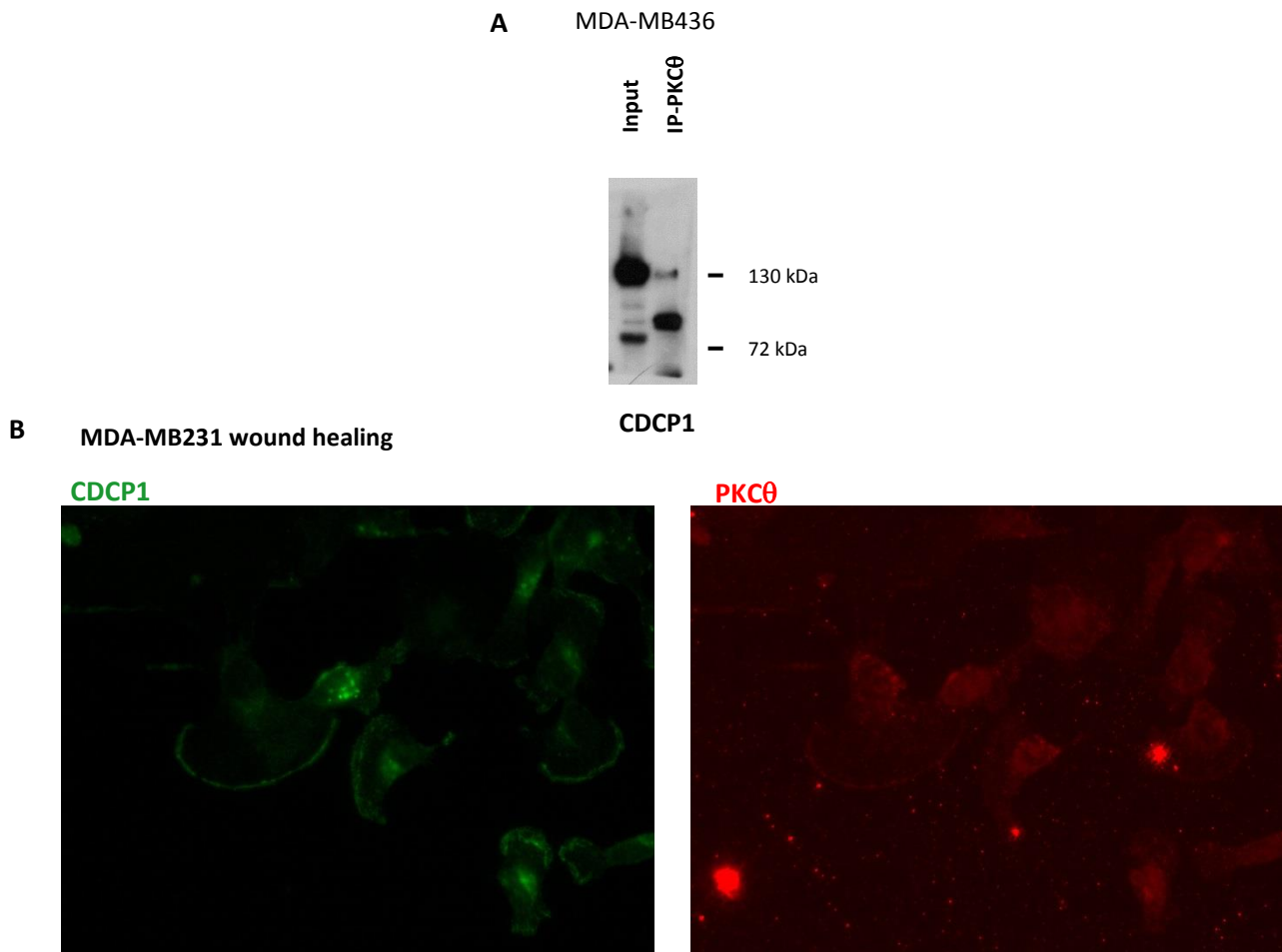


Figure 26. CDCP1 interagit avec PKCθ et se localise au front de cellules en migration. **A.** PKCθ est précipitée à partir d'extraits totaux de MDA-MB-436 selon le protocole de co-immunoprécipitation utilisé dans l'étude précédente. La co-immunoprécipitation de CDCP1 est analysée par western blot. **B.** 1.5×10^5 cellules MDA-MB-231 sontensemencées sur lamelles. Lorsque la confluence est quasi-atteinte, une blessure est formée via l'utilisation d'un cône 1000μl. 7 heures plus tard les cellules sont fixées à l'éthanol acétone, bloquées à la BSA pendant 1h30 et marquées avec un anticorps primaire anti CDCP1 rabbit et PKCθ mouse à 4°C sur la nuit, puis avec l'anticorps secondaire (rabbit 488 pour CDCP1 et mouse 555 pour PKCθ) durant 2h à température ambiante.

L'inhibition de CDCP1 dans les MCF7 surexprimant PKC θ suggère que CDCP1 contrôle l'action de PKC θ sur l'invasion en dehors d'un effet sur sa fonction catalytique. Or, étant donné qu'une inhibition de CDCP1 dans des lignées MDA-MB436 n'affecte pas la co-immunoprécipitation PKC θ /FAK, il semble que ce ne soit pas en impactant cette interaction, bien qu'il faille considérer la possibilité de mécanismes différents selon les lignées cellulaires. Cette éventualité sera testée en menant les expériences de co-immunoprécipitation PKC θ /FAK en inhibant CDCP1 dans les MCF7.

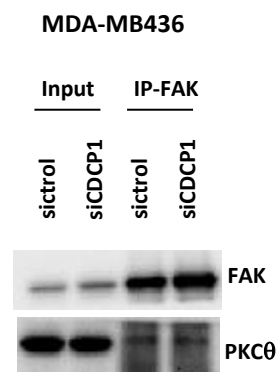


Figure 27. L'inhibition de CDCP1 n'affecte pas le niveau d'interaction entre PKC θ et FAK. CDCP1 est inhibé par ARNi (siCDCP1-2, 48 heures de transfection) et l'interaction PKC θ /FAK est testée par précipitation de FAK sur les extraits totaux (comme décrit dans l'étude précédente). La co-précipitation de PKC θ est évaluée par western blot.

L'observation de la localisation de CDCP1 au front des cellules en migration nous permet de proposer une autre hypothèse concernant la régulation de PKC θ par CDCP1. En effet, nous avons constaté que CDCP1 peut être enrichi au front de migration des cellules en l'absence de PKC θ mais que l'inverse n'est pas vrai : CDCP1 est systématiquement enrichi au front lorsque PKC θ y est enrichie. Ainsi, nous supposons que CDCP1 pourrait réguler la localisation de PKC θ au front de migration. Nous avons commencé à tester cette hypothèse en inhibant CDCP1 par ARNi dans des MDA-MB231 sur lesquels nous avons tenté de mener des

expériences de comblement de blessure. Cependant, l'inhibition de CDCP1 affectant la prolifération des cellules, il a été difficile d'obtenir le niveau de confluence nécessaire pour obtenir une bonne polarisation et migration des cellules. Pour contourner ce problème, nous comptons observer la localisation de mutants de PKC θ (PKC θ 63A et 68A) décrits par Stahelin et al. comme n'interagissant plus avec le fragment de CDCP1. Après avoir vérifié que ces mutants n'interagissent plus, nous pourrions comparer leur localisation à celle de PKC θ wt.

Nous surexprimerons ces mutants de PKC θ (construits sur une PKC θ constitutivement active) dans des MCF7 et observerons leur capacité à induire l'invasion. Toutefois, l'utilisation de ces mutants ne nous permettra pas de conclure dans l'hypothèse où CDCP1 régule la localisation ou l'invasion de PKC θ de façon indirecte, sans dépendre de son interaction avec PKC θ .

Pour terminer la conclusion de cette étude, il est intéressant de noter que les MCF7 expriment très peu CDCP1, au point que nous ne sommes pas parvenus à la détecter par western blot. Or l'inhibition de son expression par ARNi inhibe la presque totalité des effets de la surexpression d'une PKC θ constitutivement active dans ces cellules. Aussi, il pourrait être supposé que les effets de l'ARNi sur l'invasion ne sont pas liés à l'inhibition de l'expression de CDCP-1. Cependant, nous avons testé indépendamment deux ARNi différents dirigés contre des régions différentes de l'ARNm de CDCP-1 réduisant la possibilité d'un artéfact lié à un ARNi particulier. De plus, ces deux ARNi n'impactent pas le niveau d'expression de PKC θ . Qui plus est, Hooper et al., détectent faiblement CDCP1 par western blot d'extraits de MCF7 (Hooper et al., 2003). Aussi, nous comptons essayer de mettre au point des conditions de western blot nous permettant également de détecter CDCP1 mais aussi, mesurer le niveau d'ARNm de CDCP1 par RT-QPCR. Si nous parvenons à montrer que CDCP1 est bien exprimé dans nos cellules, nous rajouterons un niveau d'intérêt à cette étude puisque nous montrerons qu'une très faible quantité de CDCP1 est nécessaire aux effets de la surexpression de PKC θ qui est pourtant constitutivement active.

Dans l'ensemble, l'aboutissement de cette étude pourra permettre de mettre à jour un nouveau mécanisme de régulation de PKC θ tout en expliquant le rôle attribué à CDCP1 sur l'agressivité des cancers du sein triple-négatifs.

MATERIEL ET METHODES.

Le matériel et les méthodes présentés ici en première partie se réfèrent à la deuxième étude sur CDCP1. Une deuxième partie vient compléter le matériel et méthodes de l'article de la première étude.

Étude du contrôle de PKC θ par CDCP1 : matériel et méthodes.

Culture cellulaire.

Les différentes lignées utilisées (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436) ont été achetées à l'ATCC et cultivées selon leurs recommandations. La lignée exprimant PKC θ constitutivement active de façon stable sous le contrôle de la doxycycline (MCF7-Tetoff-PKC θ) a été construite par Belguise et al. en 2012 (Belguise et al., 2012). L'inhibition de l'expression de PKC θ est induite par un traitement des cellules à la doxycycline (0,01 microgrammes/ml, Sigma) de 48h.

Transfection d'ARNi.

Des duplexes d'ARNi ont été transfectés à une concentration finale de 3,6nM par transfections réverses en utilisant l'Interferin (Ozyme) selon les recommandations d'Ozyme.

ARNi.

Les duplexes d'ARNi ont été synthétisés par Eurofins Genomics GmbH selon les séquences suivantes :

siCDCP1-1: GCTCTGCCACGAGAAAGCAACATTA

siCDCP1-2: TCAGCATTGCAAACCGCTCATCTAT

siControl: 5'-AGGTAGTGTAATCGCCTTG-3'

Extraits cellulaires, western blot et co-immunoprécipitation.

Les cellules sont lysées à 4°C en dans un tampon de lyse à 10mM EDTA, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 40 mM Tris (pH8) et contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les extraits cellulaires totaux ainsi obtenus sont analysés par western blot (Gel SDS Page 10% Acrylamide). Pour la co-immunoprécipitation, 1000µg de protéines totales sont incubées à 4°C sous agitation avec des billes de protéine A-Sépharose (GE-Healthcare). Les extraits sont ensuite incubés sur la nuit sous agitation à 4°C avec 1µg d'anticorps anti-PKCθ avant d'être incubés durant 2h à 4°C avec les billes de protéine A-Sépharose. Après 5 lavages au tampon de lyse, les extraits sont chargés pour analyse par western blot.

Tests d'invasion.

48 h après transfection et induction ou non de l'expression de PKCθ à la doxycycline, 300 000 (pour siControl) ou 600 000 cellules (pour siCDCP1-1 ou-2) sontensemencées dans la partie supérieure d'un insert de type Transwell (8mm de diamètre, pores de 8µm, Costar, Cambridge, MA, USA) recouverte d'une couche de 100µL de Matrigel à 300µg/ml(BD Bioscience) et incubées durant 48h à 37°C. En parallèle, 15 000 (siControl) ou 30 000 (siCDCP1) cellules sontensemencées dans boîtes de 24 puits pour contrôler la prolifération et 250 000 (siControl) ou 500000 (siCDCP1) cellules sontensemencées dans des boîtes de 12 puits pour analyse par western blot. Les cellules ayant envahi la couche de matrigel et la prolifération des cellules sont quantifiées par un essai enzymatique à la deshydrogénase mitochondriale en utilisant le 3 (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenol tetrazolium bromide (MTT) et la mesure de l'absorbance à 540nm. L'invasion relative est calculée en divisant la valeur de l'invasion par la valeur de prolifération de la condition correspondante.

Anticorps.

Les anticorps anti PKC θ , FAK (western blot) et CDCP1 (western blot et immunofluorescence) sont de Cell Signalling Technologies. Les anticorps anti pT538-PKC θ et les anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence (Alexa Fluor 488 et 555) sont d'Invitrogen. L'anticorps anti PKC θ utilisés en immunofluorescence est de BD Biosciences, celui dirigé contre l'actine et l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxidase utilisés en Western Blot sont de chez Sigma. Enfin, l'anticorps secondaire anti lapin couplé à la peroxidase est de Jackson Immuno Research.

Wound healing et Immunofluorescence.

Pour les expériences de Wound Healing, 1.5×10^5 cellules ont étéensemencées sur des lamelles de 22mm de diamètre dans des boîtes de 12 puits. Une fois la confluence quasi-atteinte (24h plus tard), la blessure est formée en utilisant le cône d'une pipette p1000. Les cellules sont fixées 7h plus tard avec une solution d'éthanol acétone (50/50) à -20°C durant 20 minutes. Les cellules fixées sont alors incubées durant 1 heure et 30 minutes dans un tampon 1% BSA PBS-0.03% Tween (PBST), avant de les incuber sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (dilués au 1/50). Après trois lavages au PBS, les cellules sont incubées durant 2 heures avec les anticorps secondaires. Une fois lavées, les lames sont montées avec le ProLong Gold Antifade Reagent d'Invitrogen. Les images des cellules ont été prises avec un microscope à fluorescence Leica DM5000 avec l'objectif 40x (eau).

Complément au matériel et méthodes de l'étude sur l'implication de FAK dans le contrôle de l'invasion par la PKC θ : descriptions des différentes sondes FRET utilisées.

Principe du FRET

Le processus de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) implique le transfert d'énergie d'un fluorophore donneur excité à un fluorophore accepteur de façon non radiative. Les expériences de FRET s'appuient sur la mesure de l'émission du fluorophore accepteur suite à l'excitation du donneur. Afin que le FRET ait lieu de façon efficace, le spectre d'émission du

donneur doit recouper le spectre d'excitation de l'accepteur et les deux fluorophores doivent être séparés de 2 à 10 nm (Broussard et al., 2013).

Sondes FRET reflétant l'activité des petites Rho-GTPases.

Ces sondes sont des sondes unimoléculaires construites par le groupe de Klaus Hahn selon le principe suivant : chaque sonde comprend une Rho GTPase (RhoA, Rac ou Cdc42) suivie des deux fluorophores (variants de GFP: YFP et CFP) eux-mêmes suivis par un fragment du premier effecteur de ces Rho GTPases (fragment de PAK pour Rac et Cdc42, Rho binding domain, RBD pour RhoA). Lorsque la RhoGTPase est activée (liée au GTP) celle-ci est capable de se lier à son premier effecteur, ce qui a pour conséquence de rapprocher les deux fluorophores et d'augmenter la possibilité de transfert d'énergie entre le fluorophore donneur (CFP) et le fluorophore accepteur (YFP) et ainsi le phénomène de FRET (**Figures 28 et 29**).

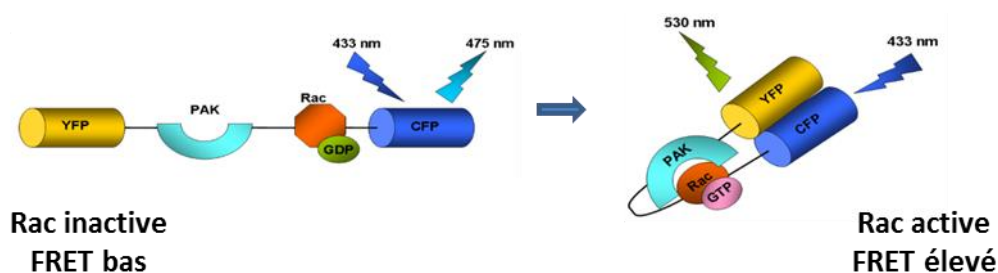


Figure 28. Schéma de la sonde FRET de la Rho GTPase Rac. La sonde Cdc42 est construite selon le même principe

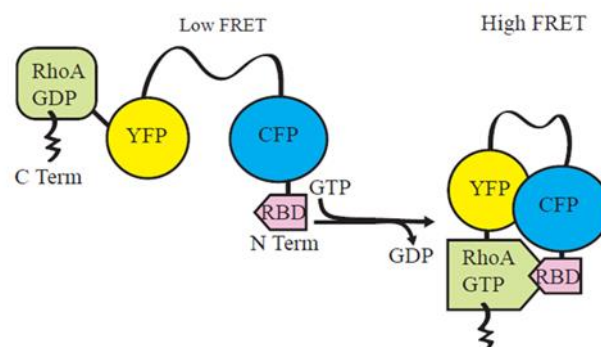


Figure 29. Schéma de la sonde FRET de la Rho GTPase RhoA.

Sonde reflétant l'ouverture de FAK.

La sonde intramoléculaire FAK-FRET a été construite suivant le modèle de celle décrite par Papusheva et al. (Papusheva et al., 2009). Ainsi, le fluorophore CFP a été inséré au site 391 entre le domaine kinase et le domaine FERM, et le YFP a été inséré en N-terminal après le domaine FERM. Nous avons vérifié que cette sonde se localise bien aux adhérences focales et avons mesuré le FRET à ce niveau. Le niveau de FRET est élevé lorsque FAK est en conformation fermée et que les fluorophores donneurs et accepteurs sont proches et diminué lorsque le domaine FERM se sépare du domaine kinase de FAK, éloignant ainsi les fluorophores (**Figure 30**).

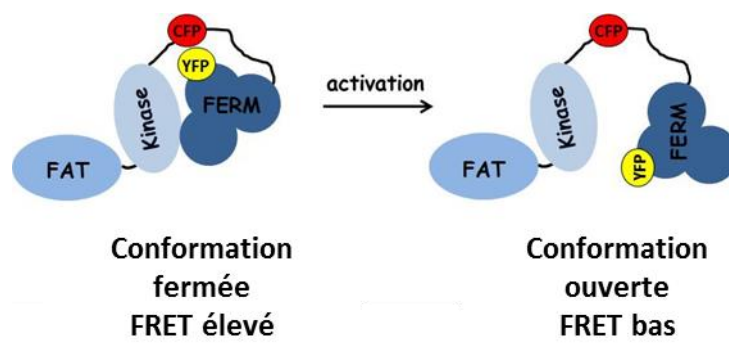


Figure 30. Schéma de la sonde FRET FAK.

DISCUSSION

Les CSTN n'ont pas bénéficié des grandes avancées thérapeutiques qui ont amélioré la prise en charge des cancers du sein RE+ ou HER2+. Ceci peut s'expliquer par la complexité des processus oncogéniques mis en jeu, les CSTN présentant un taux d'instabilité génétique supérieur à celui des autres cancers du sein (Pareja et al., 2016). Ainsi, la compréhension de la biologie des CSTN constitue un défi majeur de la recherche contre le cancer du sein. C'est dans cet objectif que se sont inscrits mes travaux de thèse, qui visaient à comprendre le rôle joué par la PKC θ dans l'invasion des CSTN.

Chapitre VII

Comment PKC θ contrôle-t-elle l'invasion des lignées CSTN *in vitro* ?

Nous montrons qu'une inhibition de PKC θ dans différentes lignées CSTN limite fortement leur invasion d'une couche de matrigel (**Figure 1 de l'article**). Ces résultats valident l'hypothèse d'un contrôle de l'invasion des cellules CSTN, hypothèse qui avait été formulée suite aux précédents travaux du laboratoire montrant que la surexpression d'une PKC θ constitutivement active augmente les capacités migratoires et invasives des MCF7 (Belguise et al., 2007; Belguise et al., 2012). Ils sont également en accord avec les résultats d'autres équipes. Ainsi, Sutcliffe et al. montrent que la surexpression de PKC θ wt affecte positivement la migration de MCF7 dans des expériences de comblement de blessure (Sutcliffe et al., 2011). Ce type d'expérience a permis également à Tang et al. de montrer qu'une inhibition de PKC θ dans des cellules endothéliales de rat limite leur migration (Tang et al., 1997), ces derniers travaux laissant penser que PKC θ est capable de contrôler la migration cellulaire de différents types cellulaires, au-delà des cellules tumorales mammaires.

7.1. PKC θ n'influence pas la transition épithélio-mésenchymateuse.

Concernant les mécanismes par lesquels PKC θ contrôle l'invasion, nous avons dans un premier temps supposé qu'elle pouvait influencer la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules tumorales mammaires. Cette hypothèse s'appuyait sur des résultats de

Sutcliffe et al. qui montrent, par des expériences d'immuno-précipitation de chromatine (ChIP) réalisées à partir de lymphocytes, que PKC θ se lie aux régions régulatrices de gènes impliqués dans la TEM (Sutcliffe et al., 2011). Cependant, en surexprimant PKC θ constitutivement active dans des MCF7, nous n'avons pas observé de changement dans l'expression des marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux (vimentine, cadhérine E). Par conséquent, d'autres pistes ont été explorées.

7.2. Implication des protéases dans les effets de PKC θ .

Une autre hypothèse était que PKC θ contrôle l'invasion en favorisant la dégradation de la matrice via un contrôle des MMPs. Pour la tester, nous avons mené des tests d'invasion en surexprimant PKC θ constitutivement active dans des MCF7 et regardé sa capacité à induire l'invasion de ces cellules en présence ou non d'ilomastat, un inhibiteur large des MMPs (MMP1, 2, 3, 8 et 9). PKC θ ne semble plus capable d'augmenter l'invasion en présence d'ilomastat. Cependant, nous constatons de façon surprenante que l'ilomastat augmente fortement le niveau basal d'invasion des cellules (à un niveau supérieur à celui atteint en présence de PKC θ /sans inhibiteur; **Figure 31**). Ainsi, il est possible que PKC θ n'augmente plus l'invasion en présence d'ilomastat non pas car elle dépend des MMP inhibées, mais possiblement parce que le niveau d'invasion est déjà trop élevé pour qu'elle puisse avoir un effet. L'effet positif de l'inhibiteur des MMPs sur l'invasion peut être mis en lien avec des études montrant, notamment dans des cellules de cancer du sein, qu'une inhibition de protéases induit le passage d'un mode de migration mésenchymateux à amiboïde, une migration ayant été décrite comme plus rapide (Wolf et al., 2003). En supposant que dans notre cas cette hypothèse soit valide, la migration amiboïde étant indépendante de ces adhérences, il n'est pas étonnant de constater que PKC θ , dont les effets sur l'invasion dépendent des adhérences, n'affecte pas cette invasion (Friedl et al., 2003). Cependant, nous ne pouvons évidemment pas exclure que les effets de PKC θ dépendent des protéases dégradant la matrice dans le cadre de migration mésenchymateuse. Mais face à ces résultats difficiles à interpréter et ayant obtenu des résultats préliminaires sur le contrôle de FAK, nous nous sommes focalisés sur le rôle de PKC θ dans le contrôle des adhérences à la matrice.

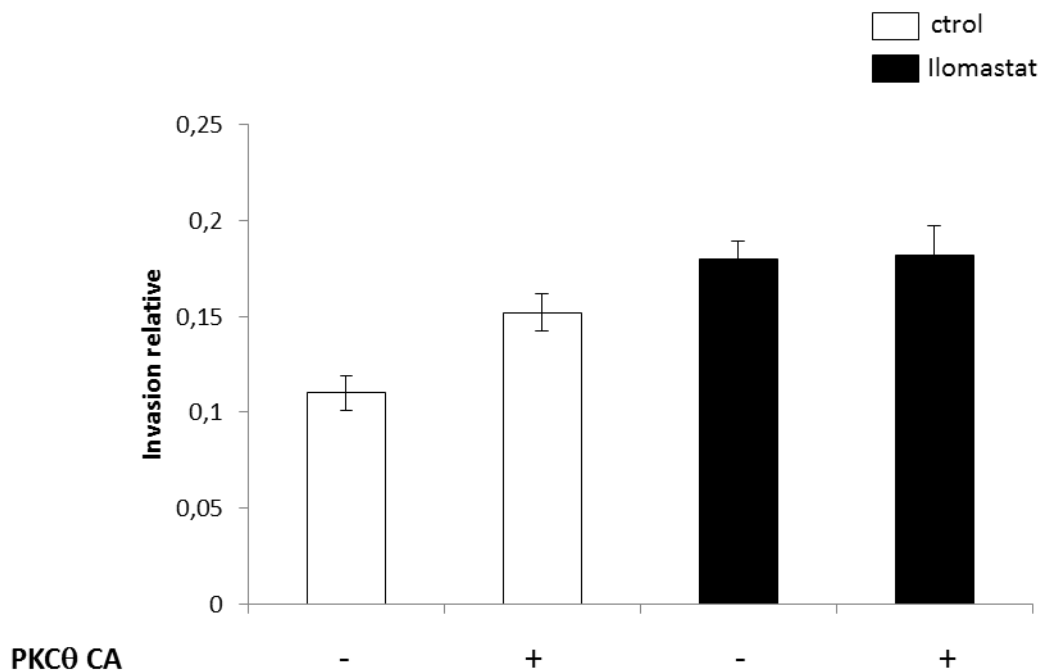


Figure 31. Rôle des MMPs dans le contrôle de l'invasion de MCF7 par PKCθ. 300 000 cellules MCF7-tetoff-PKCθ sont ensemencées dans le compartiment supérieur d'une chambre de Boyden recouverte d'une couche de matrigel (100μl à 300μg/ml), en présence ou non d'Ilomastat à 10μM dans du milieu sans sérum (F12-DMEM). 48h plus tard les cellules ayant envahi sont comptées au MTT, et l'invasion relative est calculée en rapportant ce chiffre à celui de la prolifération de cellules ensemencées en parallèle.

7.3. Le contrôle de l'invasion par PKCθ dépend de FAK.

Nous observons que l'invasion induite par PKCθ dépend entièrement de FAK (**Figure 2 de l'article**) et constatons que PKCθ contrôle FAK en la phosphorylant directement.

7.3.1. Phosphorylation directe de FAK par PKCθ sur les sérines 892-893.

Nous montrons que PKCθ phosphoryle directement FAK sur les sérines 892-893 (**Figure 6 de l'article**). La validité de ce résultat est appuyée par une étude de Grigera et al. qui identifient de nouveaux sites de phosphorylation sur la FAK de poulet par spectrométrie de masse. Parmi ces sites, est retrouvée une phosphorylation de la sérine 894 qui, lorsque nous alignons les deux séquences, correspond à la sérine 893 de la FAK humaine (Grigera et al.,

2005). Or, l'analyse spectrométrique a été faite en surexprimant la FAK de poulet dans des cellules HEK293 (des cellules embryonnaires de rein humain) qui expriment PKC θ (David et al., 2012). Ainsi, il peut être supposé que PKC θ est responsable de cette phosphorylation S894.

L'invasion induite par PKC θ dépend en grande partie de sa capacité à phosphoryler les S892-893, les effets de PKC θ sur l'invasion étant fortement affectés par l'expression d'une FAK non phosphorylable 892-893A (**Figure 7 de l'article**).

Cependant, ce mutant de phosphorylation n'empêche pas la totalité des effets de PKC θ sur l'invasion qui est toujours capable d'induire significativement l'invasion (il reste environ 25% des effets de PKC θ sur l'invasion). Au moins trois hypothèses peuvent expliquer ce résultat : la phosphorylation sur thréonine 656, l'implication de Fra1, l'effet de PKC θ sur l'ouverture de FAK.

7.3.2. Comment expliquer le contrôle de l'invasion par PKC θ non attribuable aux phosphorylations S892-893 de FAK ?

7.3.2.1. Phosphorylation directe de FAK sur la thréonine 656 ?

Nous avons supposé que les effets de PKC θ indépendants des phosphorylations S892-893 pouvaient être liés à la phosphorylation par PKC θ de la thréonine 656 de FAK. Afin de tester cette hypothèse, des expériences sont en cours pour évaluer les effets d'un mutant de FAK non phosphorylable (T656A) sur la capacité de PKC θ à induire l'invasion. Nous espérons pouvoir ainsi conclure sur l'implication de cette phosphorylation dans l'invasion avant la soumission de l'article.

7.3.2.2. Implication de Fra1 ?

L'équipe ayant montré que les effets de PKC θ sur l'invasion passent en partie par le facteur de transcription Fra1, ces 25% restant pourrait lui être attribué (Belguise et al., 2012). Cependant, nous montrons que les effets de PKC θ sur l'invasion dépendent entièrement de FAK. Ainsi, si cet effet était bien lié à Fra1, il passerait de toute façon par FAK (mais non nécessairement par les phosphorylations 892-893).

7.3.2.3. *PKC θ induit l'ouverture de FAK.*

Les effets résiduels de PKC θ sur l'invasion en dehors des phosphorylations S892-893 pourraient être liés à la capacité de PKC θ à induire l'ouverture de FAK même en l'absence de possibilité de phosphorylations sur les S892-893 (**Figure 5 de l'article**).

L'utilisation de la sonde FRET évaluant les changements de conformation de FAK nous autorise à supposer que la simple interaction de FAK avec PKC θ permet l'ouverture de FAK et donc la levée de l'auto-inhibition. En effet, nous montrons que ces effets ne dépendent pas de sa fonction kinase (la PKC θ kinase-dead ayant autant d'effets), ni des phosphorylations sur S892-893 ou T656 (PKC θ induisant l'ouverture des mutants FAK-FRET non phosphorylables). Ainsi, une telle activation de FAK pourrait être responsable de l'invasion résiduelle induite par PKC θ en présence du mutant non phosphorylable FAK892-893A. La possibilité d'un contrôle de l'invasion par PKC θ indépendamment de son activité kinase est appuyée par l'étude de Sutcliffe et al. qui montrent que la surexpression d'une PKC θ wt non activée dans des MCF7 est capable d'induire la migration de ces cellules (Sutcliffe et al., 2011).

Le domaine V3 de PKC θ est à l'origine de ses effets sur l'ouverture de FAK. En effet, un mutant de PKC θ tronqué de ce domaine n'induit plus l'ouverture de FAK. L'implication de ce domaine V3 est particulièrement intéressante car, malgré le grand degré de conservation des PKCs entre elles, ce domaine est spécifique à PKC θ (Zhang et al., 2013). Ainsi, ce domaine pourrait expliquer la spécificité des effets de PKC θ sur FAK par rapport aux autres PKCs dans ces cellules de cancer du sein.

Nous sommes en train d'évaluer l'importance de ce mécanisme d'ouverture dans le contrôle de l'invasion et de la voie FAK. Nous voulons également comprendre la relation entre l'ouverture de FAK et les phosphorylations S892-893 induites par PKC θ . Notamment, nous nous demandons si l'ouverture induite par PKC θ est nécessaire à la phosphorylation de FAK par PKC θ . Pour tester ces hypothèses, nous pourrions utiliser le mutant de PKC θ tronqué du domaine V3 qui n'est plus capable d'induire l'ouverture de FAK.

Au-delà de ses effets directs sur FAK, PKC θ contrôle la signalisation de FAK, contrôle qui est, au moins en partie, impliqué dans son induction de l'invasion.

7.3.3. PKC θ induit la signalisation de FAK.

En aval du contrôle direct de FAK, PKC θ est capable d'induire la signalisation de FAK, étudiée en mesurant par western blot les niveaux de phosphorylations sur les Y397, Y925, Y576/577 de FAK, Y118 de la paxilline et Y416 de Src (**Figure 2 de l'article**). Nous montrons que les effets de PKC θ sur cette signalisation semblent spécifique à cet isoforme, en utilisant des ARNi spécifiques et en montrant que l'inhibition des PKC α , ϵ et δ n'affecte pas cette signalisation dans nos cellules (**Figure supp. 1 de l'article**).

Afin d'impliquer cette signalisation dans ses effets sur l'invasion *in vitro*, nous avons étudié les conséquences d'une inhibition de l'expression de la paxilline et de Src sur les effets de PKC θ . Nous constatons que l'ARNi de la paxilline inhibe complètement, tout comme celle de FAK, les effets positifs de PKC θ sur l'invasion (**Figure supp. 1 de l'article**). En revanche, nous avons observé que nous ne perdons pas totalement les effets de PKC θ suite à l'inhibition de Src. Cependant, ce résultat est difficile à interpréter étant donné que l'ARNi utilisé ne parvient pas à bloquer complètement l'expression de Src (résultats non montrés).

L'induction des phosphorylations Y397, Y925, Y576/577 de FAK par PKC θ dépend fortement de sa capacité à phosphoryler FAK sur les sérines 892-893, les effets de PKC θ constitutivement active étant fortement diminués sur le mutant non-phosphorylable FAK 892-893A (dans une moindre mesure sur le mutant FAK 656A ; **Figure 6 de l'article**). Ainsi, la question qui se pose est de savoir comment les phosphorylations sur S892-893 affectent les phosphorylations Y397, Y925, Y576/577.

Nous avons dans un premier temps supposé que les phosphorylations S892-893 ou T650-656 pouvaient affecter l'activité catalytique de FAK et ainsi sa capacité à s'auto-phosphoryler sur la Y397 et à recruter Src qui phosphoryle FAK sur les Y925 et 576/577. Cependant, les essais kinases que nous avons menés *in vitro* avec les mutants non phosphorylables FAK 892-893A ou 650-656 A n'ont pas été concluants (*résultats non montrés*).

Il a été montré que l'activation de FAK peut dépendre de sa dimérisation (Brami-Cherrier et al., 2014). Ainsi, il était possible d'imaginer que les phosphorylations 892-893 facilitent cette dimérisation et ainsi la signalisation de FAK. Cependant, un mutant de FAK incapable de dimériser, n'affectant pas la capacité de PKC θ à activer FAK, nous avons écarté cette possibilité (résultat non montré).

Enfin, la compréhension du lien entre les phosphorylations S892-893 et Y397 a été compliquée par l'obtention récente d'un résultat surprenant: le mutant phosphomimétique 892-893E présente en western blot un niveau de phosphorylation sur la Y397 largement inférieur à la FAK wt (résultat non montré). Il est difficile d'établir une relation logique entre ce résultat et la capacité de PKC θ à induire la phosphorylation Y397 qui est fortement affectée par un mutant non phosphorylable 892-893A. Ces deux résultats opposés pourraient être réconciliés en considérant le fait que la phosphorylation sur S892-893 est un événement qui pourrait être très transitoire, les niveaux observés par western blot étant relativement bas même lors d'une surexpression d'une PKC θ constitutivement active. Le mutant phosphomimétique 892-893E mime un mutant constitutivement phosphorylé, et ainsi nous ne reproduisons pas la dynamique de cette phosphorylation. Aussi, l'impact sur cette dynamique pourrait expliquer les effets contraires observés. La phosphorylation 892-893 pourrait effectivement de façon temporaire diminuer la 397, mais, en ayant d'autres effets moins transitoires et possibles uniquement suite à sa déphosphorylation, elle pourrait avoir pour conséquence globale d'augmenter la p-Y397. Ces « autres effets » pourraient être ceux sur la dynamique des adhérences.

Chapitre VIII

Comment PKC θ affecte-t-elle la dynamique des adhérences ?

Nous observons que la surexpression d'une PKC θ constitutivement active dans des MCF7 ou l'activation de PKC θ par le système rapamycine affecte la dynamique des adhérences. En

effet, nous constatons qu'en présence de PKC θ , ou suite au rajout de la rapamycine avec le système PKC θ activable, l'aire globale des adhérences contenues dans chacune des sections varie beaucoup au cours du temps, à la fois dans le sens d'une augmentation que dans celui d'une diminution; et ce, alors que dans les conditions contrôles (vecteur vide ou avant l'ajout de la rapamycine) ces aires sont beaucoup plus stables au cours du temps (**Figures 3 et 4 de l'article**). Ces résultats suggèrent que PKC θ est capable d'induire l'assemblage et le désassemblage des adhérences. Cependant, afin de nous assurer de ces effets nous comptons suivre les adhérences de façon individuelle (et non par sections qui peuvent contenir jusqu'à 4 adhérences différentes) afin de quantifier précisément l'effet de PKC θ sur les taux d'assemblage et de désassemblage des adhérences.

Nous constatons toutefois des différences entre les deux systèmes: les effets de la surexpression d'une PKC θ constitutivement active sur la dynamique des adhérences semblent beaucoup plus importants que ceux de l'ajout de la rapamycine dans les MCF7 contenant la PKC θ activable.

8.1. Réflexions sur l'outil PKC θ -activable par la rapamycine.

8.1.1. Interaction et phosphorylations.

Le système de PKC θ -activable a été conçu en collaboration avec l'équipe de Klaus Hahn selon le même principe qu'une FAK-activable que ce laboratoire a construite: l'insertion d'un domaine iFKBP (insertable FKBP, peptide issu de la protéine FKBP12) dans le domaine catalytique de FAK modifie la rigidité de ce domaine inhibant ainsi fortement l'activité catalytique de FAK. La liaison du peptide FRB (FKBP12-rapamycin binding domain) au domaine iFKBP permise uniquement par l'intermédiaire de la rapamycine restaure le degré de rigidité de l'iFKBP et ainsi l'activité catalytique de FAK (Karginov et al., 2010). Dans notre cas, l'insertion de l'iFKBP ne devrait pas affecter l'interaction de PKC θ avec FAK via son domaine FERM. Or, nous avons vu que cette simple interaction indépendamment de la fonction kinase de PKC θ induit l'ouverture de FAK et donc possiblement son activation (**Figure 5 de l'article**). L'activation de FAK ayant été associée à la dynamique des adhérences (Mitra et al., 2006), il est possible de supposer que même en l'absence de rapamycine, les effets de PKC θ -iFKBP sur l'ouverture de FAK impacteraient déjà positivement la dynamique des adhérences. Ainsi, ceci permettrait d'expliquer les effets moins drastiques d'un simple

ajout de la rapamycine comparés à ceux d'une surexpression d'une PKC θ constitutivement active qui permet à la fois l'interaction de PKC θ avec FAK mais aussi la phosphorylation (par rapport à des cellules sans PKC θ). La comparaison de la dynamique des adhérences de cellules MCF7 exprimant un vecteur vide, à celle, de cellules MCF7 exprimant la PKC θ -iFKBP activable en l'absence de rapamycine devrait nous permettre d'évaluer l'ampleur de l'effet médié uniquement par l'interaction avec FAK de cette PKC θ -activable. Enfin, l'hypothèse d'un effet résiduel de la PKC θ -iFKBP non activée sur la dynamique des adhérences lié à sa capacité à interagir avec FAK (sans rapamycine) pourrait expliquer l'effet résiduel de PKC θ sur l'invasion en présence de la FAK non phosphorylable S892-893A (sous partie 7.3.2.).

8.1.3. Effets de la rapamycine.

Une autre façon d'expliquer les différences entre les deux systèmes (PKC θ constitutivement active vs PKC θ -activable) peut être envisagée en considérant les effets de la rapamycine sur la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin). En effet, il a été très récemment rapporté que la rapamycine inhibe l'activation de FAK (pFAK-Y397) dans des cellules souches mésenchymateuse de rat possiblement via une inhibition de mTOR (Lee et al., 2017). Bien que les auteurs de cette étude utilisent des concentrations de rapamycine bien supérieures aux nôtres (5 μ M contre 40nM), il peut être supposé que la quantité de rapamycine utilisée dans nos expériences soit suffisante pour inhiber légèrement FAK et ainsi diminuer les effets de l'activation de PKC θ sur la dynamique des adhérences.

8.1.4. Apports de l'outil.

Malgré les considérations précédentes, cet outil de PKC θ -activable nous aide à comprendre les effets de PKC θ sur la dynamique des adhérences. Tout d'abord, il nous permet de constater que la fonction kinase de PKC θ influence la dynamique des adhérences. De plus, cet outil nous apprend que les effets de PKC θ sur cette dynamique sont visibles rapidement (quelques minutes) après l'activation de la fonction catalytique (qui correspond à la colocalisation du FRB avec la PKC θ -iFKBP,). Ainsi, il peut être supposé que les effets de PKC θ sur la dynamique des adhérences mais aussi des protrusions sont relativement directs. Le caractère direct de ses effets est aussi appuyé par les informations spatiales que peut nous

fournir cet outil. En effet, il semble y avoir une colocalisation (globale) de l'interaction PKC θ - iFKBP/FRB, qui signe l'activation de PKC θ , avec les effets sur les protrusions et les adhérences (nous observons que de nouvelles protrusions se forment dans les régions de la cellule où PKC θ et le FRB co-localisent; **Figure supp. 4 de l'article**). Afin, d'obtenir des informations spatiales plus précises, nous comptons dans les prochains jours utiliser une rapamycine encagée qui peut être libérée par la lumière, comme celle précédemment utilisée également par le groupe de Klaus Hahn (Karginov et al., 2011). Ainsi, nous devrions être capables d'induire une activation localisée de PKC θ et d'observer les effets locaux sur la dynamique des adhérences et des protrusions.

L'outil PKC θ -activable nous ayant appris que la fonction catalytique de PKC θ est impliquée dans la dynamique des adhérences, nous nous sommes intéressés à l'implication des phosphorylations de PKC θ sur FAK sur la dynamique des adhérences.

8.2. Comment les phosphorylations S892-893 impactent-elles la dynamique des adhérences ?

En exprimant des mutants non phosphorylables FAK 892-893A et 656A dans des MCF7, nous montrons que les effets de PKC θ sur les adhérences dépendent en grande partie de sa capacité à phosphoryler les S892-893 de FAK et dans une moindre mesure la T656 (**Figure 7 de l'article**). En effet, en présence de FAK 892-893A non phosphorylable, PKC θ induit beaucoup moins les variations d'aires des adhérences. En étudiant précisément les heatmaps associées à ces expériences, il semble toutefois qu'en présence du mutant non phosphorylable 892-893A, l'induction d'une dynamique dans le sens d'augmentation de l'aire des adhérences soit encore possible. Ainsi, il est envisageable que les effets de PKC θ sur l'assemblage des adhérences ne soient pas complètement empêchés par l'impossibilité de phosphoryler FAK sur les S892-893. Ces effets résiduels pourraient de nouveau être associés à la capacité de PKC θ à induire l'ouverture de FAK même porteuse des mutations 892-893A.

8.2.1. Les phosphorylations 892-893 affectent la localisation intracellulaire de FAK.

Nous possédons quelques éléments permettant de relier les phosphorylations S892-893 au contrôle de la dynamique des adhérences. Premièrement, nous constatons par immunofluorescence sur des cellules MDA-MB231 que FAK phosphorylée sur S892-893 est absente des adhérences focales (grosses adhérences matures) mais est localisée au front des cellules en migration où se forment et se désassemblent les adhérences naissantes (nous avons attribué le signal nucléaire à du signal non spécifique, les ARNi dirigés contre FAK n'ayant pas affecté ce signal ; **Figure 7 de l'article**). Ce résultat est à mettre en relation avec le fait que nous avons souvent observé, également par immunofluorescence, que le marquage de PKC θ phosphorylée sur sa T538 (marquant son activation) est fortement diminué au niveau des adhérences matures dans les cellules MDA-MB-231 (**Figure 32**).

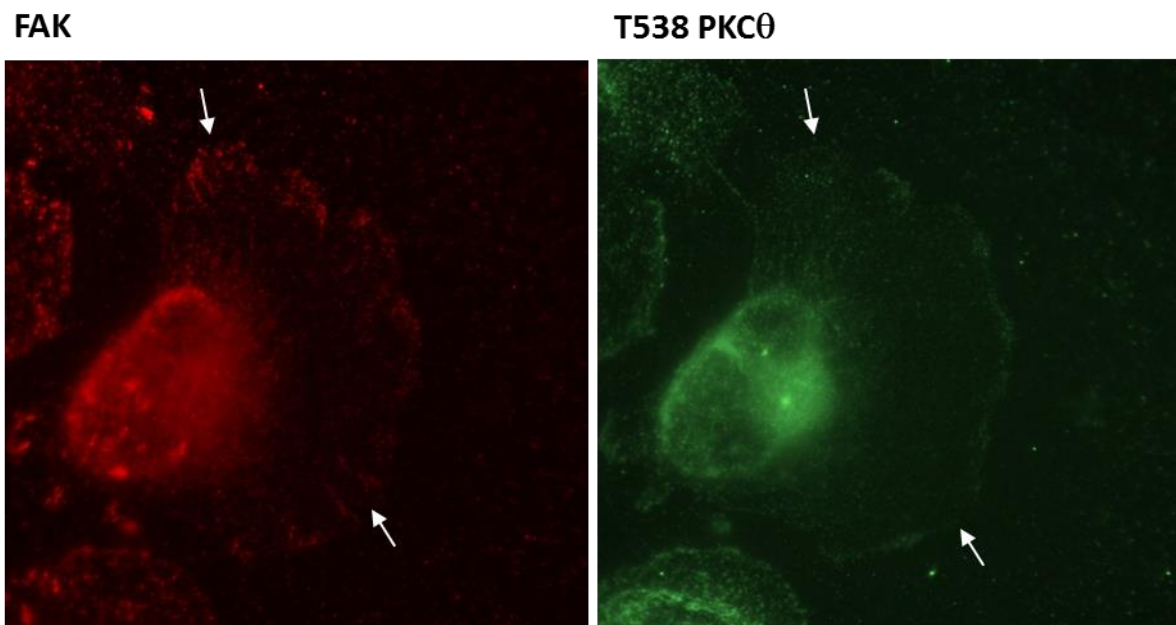


Figure 32. Le signal de la PKC θ activé (T538) est fortement diminué autour des adhérences matures. Immunofluorescence d'une cellule MDA-MB-231 en migration marquée par immunofluorescence avec un anti-corps anti FAK (rouge) et anti-T538-PKC θ (vert). Les flèches blanches indiquent les adhérences matures autour desquelles le signal T538 est diminué.

Ainsi, il pourrait être supposé que l'absence de FAK p-892-893 aux adhérences matures soit uniquement le fait de l'absence d'une PKC θ activée à ce niveau, ou alors, que cette observation est le résultat de phosphatases spécifiquement actives aux adhérences matures. Or, un mutant FAK 892-893E (mimant les phosphorylations) surexprimé dans des MCF7 n'est pas non plus localisé aux adhérences matures, contrairement à la FAK wt surexprimée, suggérant que cette phosphorylation S892-893 exclut FAK des adhérences (résultats en cours d'analyse). Ainsi, ces résultats laissent supposer que les phosphorylations S892-893 de FAK régulent sa localisation aux adhérences.

8.2.2. Les phosphorylations 892-893 affectent l'interaction de FAK avec la paxilline.

L'interaction de FAK avec la paxilline ayant été impliquée dans la localisation de FAK aux adhérences (Tachibana et al., 1995), nous avons voulu tester l'effet de ces phosphorylations de FAK sur son interaction avec la paxilline. Nous constatons que le mutant FAK 892-893E (phosphomimétique) interagit beaucoup moins avec la paxilline que FAK wt (**Figure 33**). Ce résultat peut être interprété d'au moins deux façons différentes. Premièrement, il est possible que cette interaction diminuée soit juste la conséquence des différences de localisation entre FAK wt (pouvant s'intégrer dans toutes les adhérences où est enrichie la paxilline, augmentant la probabilité d'une interaction) et FAK 892-893E (exclue des adhérences matures). Ainsi, la différence d'interaction avec la paxilline du mutant 892-893E serait uniquement l'effet et non la cause des différences de localisation de ce mutant.

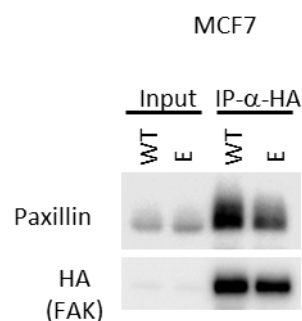


Figure 33. Interaction de FAK 892-893E avec la paxilline. 4μg des plasmides phm6-FAKwt ou phm6-FAK-892/893E sont transfectés dans des MCF7 (Genjet de Tetubio), 48 heures plus tard, les cellules sont lysées et 500μg des extraits cellulaires totaux sont incubées sur la nuit à 4°C avec 0,5μg d'anticorps anti-HA (Santa Cruz) puis durant deux heures avec des billes A-sepharose (GE-Healthcare). Après lavages, la co-immunoprécipitation de la paxilline est testée par western blot.

Deuxièmement, il peut être envisagé que les phosphorylations sur S892-893 influencent directement (biochimiquement) la capacité de FAK à interagir avec la paxilline et ainsi sa localisation aux adhérences. L'effet sur l'interaction avec la paxilline du mutant 892-893 E serait alors la cause des différences de localisation de ces mutants. Afin de trancher entre ces deux hypothèses, nous comptons évaluer les différences d'interaction entre FAK wt et 892-893E *in vitro* par GST pull down. Dans ce cas-là, la localisation ne pouvant pas impacter sur l'interaction des deux protéines, nous pourrions dire si oui ou non les phosphorylations 892-893 déstabilisent directement l'interaction avec la paxilline.

Dans la littérature, plusieurs articles peuvent également appuyer l'hypothèse d'un effet direct de ces phosphorylations sur l'interaction avec la paxilline. Ces articles peuvent également nous permettre de supposer que les effets de la phosphorylation 892-893 sur l'interaction diminuée avec la paxilline expliquent ceux sur la dynamique des adhérences et même des protrusions.

Tout d'abord, il a été montré que la paxilline interagit avec FAK par l'intermédiaire de deux patches hydrophobes dans le domaine FAT à proximité des sérines 892-893 (Hayashi et al., 2002). De plus, les effets, de différentes phosphorylations situées à proximité des sérines 892-893 (de part et d'autre) sont similaires aux effets des phosphorylations S892-893, à la fois en terme d'interaction avec la paxilline qu'en termes de conséquences sur la dynamique des adhérences et des protrusions. Ainsi, Deramaudt et al. ont montré par co-immunoprécipitation menées sur des fibroblastes murins (MEFs) qu'une FAK non phosphorylable sur la tyrosine 925 (FAK Y925F) interagit beaucoup plus avec la paxilline sans qu'ils n'observent de différence dans la localisation aux adhérences de ce mutant. De plus, ce mutant FAK 925F affecte négativement la dynamique de rétraction des protrusions ainsi que la dynamique de désassemblage des adhérences et limite les capacités migratoires de ces cellules. A l'inverse, un mutant phosphomimétique (FAK Y925E) affecte positivement la formation de protrusion, la formation d'adhérences naissantes (en comparaison au mutant non phosphorylable (Y925F)) et la migration de ces cellules. Par conséquent, la phosphorylation sur la tyrosine 925 de FAK semble, tout comme celles sur les sérines 892-

893, limiter l'interaction avec la paxilline mais également affecter la dynamique des protrusions et des adhérences ainsi que la migration (Deramaudt et al., 2011).

Ces travaux sont en accord avec ceux de Kadaré et al., qui ont étudié les effets de mutations affectant la conformation du domaine FAT de FAK. Ils observent qu'un mutant du domaine FAT qui facilite la séparation des hélices H1 et H2 du domaine FAT et qui est également associé à une augmentation des phosphorylations sur les tyrosines 925, 861 et sur la sérine 910, présente un niveau d'interaction avec la paxilline diminué et affecte le turnover des adhérences. De plus, les auteurs montrent que ce mutant, tout comme notre mutant FAK 892-893E, présente une localisation aux adhérences focales diminuée (Kadaré et al., 2014).

Les résultats de ces études permettent de faire une corrélation entre des phosphorylations situées à la proximité du domaine FAT et donc des sérines 892-893, à la déstabilisation de l'interaction FAK/paxilline, à une moindre localisation de FAK aux adhérences focales, à une augmentation de la dynamique des adhérences ou des protrusions et enfin, à des effets positifs sur la migration cellulaire.

Ainsi, nous pouvons supposer que les charges négatives associées aux phosphorylations sur S892-893 à proximité du domaine FAT affectent l'interaction de FAK avec la paxilline, potentiellement en modifiant la conformation du domaine FAT ou en impactant sur les niveaux de phosphorylations Y925, 861 et 910 décrites dans ces études.

De plus, ces études nous permettent de proposer que l'interaction diminuée avec la paxilline explique les effets des phosphorylations S892-893 sur la dynamique des adhérences. Il peut être modélisé, qu'au front de cellules en migration, PKC θ phosphoryle FAK sur les S892-893 ce qui a pour conséquence de déstabiliser son interaction avec la paxilline. Cette FAK phosphorylée peut facilement se détacher de la paxilline et ceci pourrait permettre le désassemblage des adhérences naissantes. La FAK ainsi libérée serait plus disponible pour faciliter la formation de nouvelles adhérences. La formation de nouvelles adhérences pourrait être potentialisée par l'effet de PKC θ sur l'ouverture de FAK. Les quantifications précises des effets des mutants de phosphorylations 892-893 sur les taux d'assemblage et de désassemblage des adhérences devraient nous permettre de tester en partie ce modèle.

Ce modèle expliquerait les effets contradictoires obtenus sur les liens entre les phosphorylations S892-893 et la Y397. Ainsi, PKC θ phosphorylerait FAK sur S892-893 au niveau d'adhérences naissantes au front de migration. Cet événement transitoire permettrait de rapidement déstabiliser l'interaction de FAK avec la paxilline et induirait le désassemblage des adhérences. La FAK ainsi libérée serait rapidement déphosphorylée (S892-893) ce qui la rendrait de nouveau capable d'interagir efficacement avec la paxilline pour former de nouvelles adhérences, événement associé à une augmentation de la phosphorylation Y397 (Mitra et al. 2006). Le mutant phosphomimétique 892-893E serait bloqué à l'étape « FAK libre » et de par son interaction diminuée avec la paxilline, s'intégrerait difficilement à de nouvelles adhérences, ce qui aurait pour conséquence globale de diminuer la phosphorylation sur la Y397.

Chapitre IX

Comment PKC θ affecte-t-elle la dynamique des protrusions ?

9.1. Implication des phosphorylations S892-893 et de RhoA.

PKC θ semble capable d'affecter la dynamique de formation de protrusion puisque nous constatons que suite à sa surexpression ou rapidement après son activation par le système rapamycine, l'aire périphérique des cellules varie beaucoup plus au cours du temps comparée à celle des conditions contrôles (augmentation et diminution de l'aire ; **Figures 3 et 4 de l'article**). Les protrusions qui se forment et se déforment sont relativement larges et plates, suggérant que ce sont des lamellipodes. Il est étonnant de voir la rapidité avec laquelle les protrusions formées se rétractent en présence de PKC θ . Les cellules utilisées pour mesurer la dynamique des protrusions n'étaient pas en migration. Ainsi, une cause possible est que l'absence de signal promigratoire indiquant une directionnalité (comme un chimiotactisme) explique la durée de vie courte des protrusions qui ne sont pas stabilisées par un signal indiquant une direction particulière.

Nous montrons que les effets de PKC θ sur les protrusions dépendent de FAK et principalement des phosphorylations S892-893 (**Figure 7 de l'article**). De plus, PKC θ affecte la dynamique des activités des Rho GTPases (tout particulièrement celle de RhoA) et ces effets dépendent de FAK. Or, une inhibition de RhoA limite fortement les effets de PKC θ sur l'invasion (**Figures supp. 3 de l'article**). Ainsi, il est fort probable que les effets de PKC θ sur la formation des protrusions passent par un contrôle de RhoA dépendant de FAK, plus précisément des phosphorylations sur S892-893. Il a été montré que FAK est capable de réguler les cycles d'activation/inactivation de RhoA via sa capacité à interagir avec p190RhoGAP et p190RhoGEF affectant la formation de lamellipodes dans des fibroblastes (Lim et al., 2008; Tomar et al., 2009). Il est également connu que p190Rho GEF interagit directement avec le domaine FAT de FAK (Zhai et al., 2003). Or, les sérines 892-893 sont à proximité directe de ce domaine FAT (résidus 917 à 1053). Ainsi, il pourrait être imaginé que les phosphorylations sur S892-893 affectent cette interaction impactant ainsi l'activation de RhoA et la dynamique des protrusions au front des cellules en migration.

9.2. Liens entre les effets de PKC θ sur les adhérences et ceux sur les protrusions ?

Afin de relier les effets de PKC θ sur la formation des protrusions et ceux sur la dynamique des adhérences, il peut être imaginé que la déstabilisation de l'interaction de FAK avec la paxilline induite par les phosphorylations S892-893, favorise en parallèle l'interaction de ce même domaine avec p190RhoGEF. Par conséquent, cela permettrait l'activation locale de RhoA et ainsi la formation de protrusions. Nous pourrions tester cette hypothèse par GST-pull down. Si elle se vérifiait, cela placerait PKC θ au centre d'un contrôle coordonné de la dynamique des adhérences et des protrusions.

Chapitre X

Comment PKC θ est-elle régulée dans les CSTN ?

10.1. Régulation des fonctions de PKC θ .

Nos résultats montrent que les effets de PKC θ sur l'invasion dépendent entièrement de CDCP1 qui est également fortement exprimée dans les CSTN. Ils suggèrent aussi que CDCP1 régule l'activité kinase de PKC θ mais qu'elle pourrait également réguler la localisation de PKC θ au front de cellules en migration. CDCP1 pourrait nous permettre de relier les effets de PKC θ aux intégrines (**Chapitre VI**). En effet, Casar et al., montrent dans des cellules de cancer de la prostate, que CDCP1 interagit avec l'intégrine $\beta 1$ et non l'intégrine $\beta 3$, et qu'indirectement cette interaction permet l'activation de FAK (Casar et al., 2014). Nous avons commencé à explorer cette piste et les résultats très préliminaires sont encourageants. Premièrement, nous constatons que les effets positifs de PKC θ sur l'invasion des MCF7 dépendent de l'intégrine $\beta 1$ (**figure 34**). De plus, nous avons constaté à plusieurs reprises qu'un ensemencement de nos cellules (MDA-MB-231, MDA-MB-436) sur fibronectine, un composant de la MEC se liant notamment à l'intégrine $\beta 1$, induit l'activation de T538. Cependant, ce résultat n'est pas toujours reproductible. Le collagène et la laminine ne semblent pas avoir d'effets sur l'activation de PKC θ (résultats non montrés).

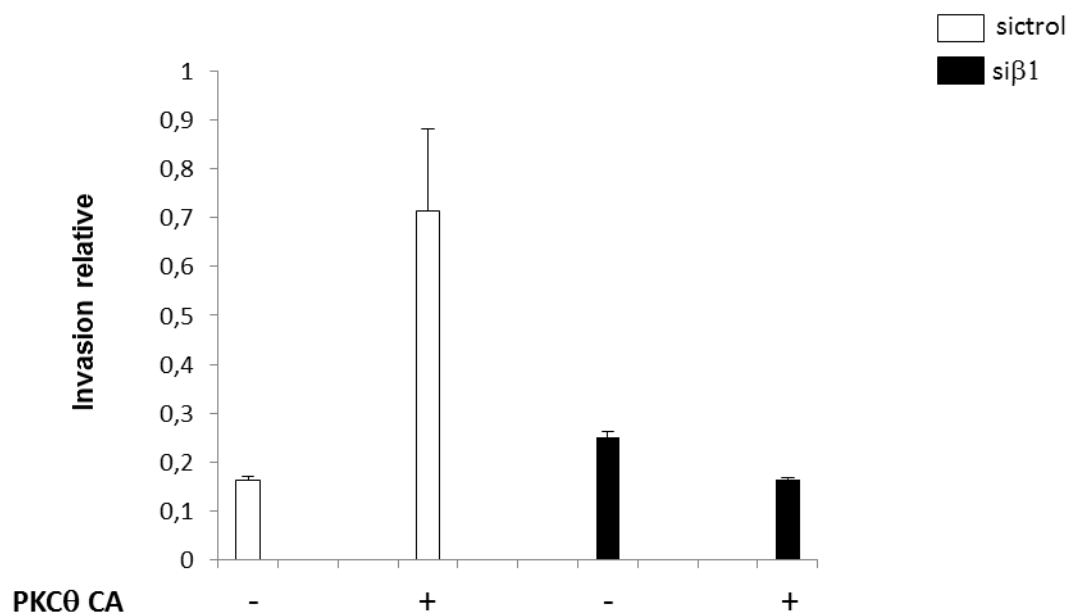


Figure 34. Les effets de PKCθ sur l’invasion dépendent entièrement de l’intégrine β1. L’intégrine β1 est inhibée par transfection de d’ARNi dans des cellules exprimant PKCθ constitutivement active de façon inducible (MCF7-tetoff-PKCθ) sous le contrôle de la doxycycline. 48h après transfection et traitement ou non à la doxycycline, un test d’invasion est lancé sur chambre de boyden. Les cellules ayant envahi sont comptées au MTT 48h plus tard et l’invasion relative est calculée en rapportant la valeur d’invasion à la valeur de prolifération évaluée pour chacune des conditions par ensemencement de cellules sur des puits en parallèle.

10.2. Régulation de l’expression de PKCθ.

PKCθ est exprimée dans les CSTN alors qu’elle ne l’est pas dans les cancers du sein exprimant le RE et les tissus mammaires normaux. Ces différences d’expression sont observées à la fois au niveau protéique qu’au niveau de l’ARN messenger de PKCθ (Belguise et al., 2012 ; Soyombo et al., 2013). En explorant les analyses du « Cancer Genome Atlas Network » menées sur 773 tumeurs mammaires, nous constatons que des amplifications du gène de PKC, *PRKCQ*, sont retrouvées dans les cancers du sein de type « basal like » sans être observées dans les cancers du sein « luminal A », « luminal B » ou « HER2+ » (Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, TCGA, 2012). Les sous-types

« basal like » et CSTN se recoupant fortement, ces résultats sont très intéressants car ils pourraient expliquer la surexpression de PKC θ dans les CSTN (**Tableau I, Chapitre I**).

Toujours concernant l'expression de PKC θ , l'étude de Soyombo et al., laisse envisager un lien entre la mutation du gène BRCA1 et l'expression de PKC θ . En effet, ils constatent dans des lignées générées à partir de fibroblastes de patients atteints de cancer et porteurs ou non d'une mutation BRCA1, que le seul gène dont l'expression varie avec le statut mutationnel de BRCA1 est celui de PKC θ . De même, ils observent que le niveau d'ARNm de PKC θ est significativement augmenté dans les lignées de cancer du sein présentant des mutations dans le gène BRCA1 (truncations ou changement du cadre de lecture ; Soyombo et al., 2011). La protéine BRCA1, dont la mutation prédispose au développement de cancers du sein, souvent triple-négatifs, est principalement impliquée dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Ainsi, il peut être imaginé que des défauts de recombinaisons homologues peuvent être à l'origine de l'augmentation du nombre de copies de *PRKCQ*. Toutefois, BRCA1 ayant également été associée à la régulation de l'expression de certains gènes, elle pourrait aussi affecter plus directement la transcription de PKC θ (Drost et Jonkers, 2013).

Chapitre XI

Comment PKC θ contrôle-t-elle la formation de métastases ?

11.1. PKC θ et les étapes du processus métastatique.

Nous avons injecté une lignée invasive de CSTN exprimant ou non un shRNA dirigé contre PKC θ dans la veine caudale de souris immunodéficientes et observé la capacité de ces cellules à former des métastases pulmonaires. Nous constatons que si 80% des souris injectées avec les cellules shRNA-contrôle présentent des métastases pulmonaires, seules 20% des souris injectées avec les cellules shRNA-PKC θ en présentent (**Figure 1 de l'article**). Ainsi, PKC θ doit jouer un rôle important dans la formation de ces métastases. Dans cet essai,

l'apparition de métastases pulmonaires implique la survie des cellules dans la circulation sanguine, la capacité des cellules à s'attacher aux parois de capillaires pulmonaires, la migration entre les cellules endothéliales et au travers la lame basale de ces vaisseaux, et enfin, la survie et la prolifération des cellules dans le nouvel environnement pulmonaire. Ainsi, la surexpression et l'activation de PKC θ doit permettre aux cellules de franchir une ou plusieurs de ces étapes. Nous avons vu *in vitro* que PKC θ contrôle positivement la capacité des cellules à traverser une couche de matrigel mimant la matrice extracellulaire. La composition du matrigel est similaire à celle des lames basales. Ainsi, il est fort probable que les effets de PKC θ sur la formation de métastases soient liés à sa capacité à induire l'invasion de la lame basale entourant les vaisseaux sanguins. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que PKC θ influence d'autres étapes de ce processus. En effet, l'activation de FAK (phosphorylation 397) a été impliquée dans la capacité de cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 à migrer entre des cellules endothéliales, (Earley and Plopper, 2008) mais également, dans la capacité de cellules tumorales mammaires murines à proliférer dans les poumons pour former des métastases (Shibue et Weinberg., 2009). Or, l'équipe ayant montré qu'une surexpression de PKC θ augmente les capacités de prolifération de cellules tumorales mammaires *in vitro* (Belguise et al., 2007), il pourrait être supposé que l'effet de PKC θ sur la formation de métastases est lié à l'induction de la prolifération des cellules arrivées aux poumons. Toutefois, si PKC θ affectait uniquement la prolifération des cellules tumorales dans les poumons, nous aurions fort probablement observé une différence de taille dans les foyers métastatiques. Or, la majorité des souris sh-PKC θ présentent une absence de métastases et non une simple diminution de taille.

11.2. Implication des phosphorylations 892-893.

Afin d'impliquer les phosphorylations identifiées *in vitro* comme permettant le contrôle de l'invasion par PKC θ , nous avons voulu évaluer le statut de phosphorylations de FAK sur S892-893 dans les cellules ayant formé des métastases pulmonaires. Nous ne sommes pas parvenus à détecter un signal. Cette absence de signal peut avoir des origines techniques: l'anticorps pourrait ne pas marcher en immunohistochimie ou la conservation des échantillons a pu ne pas permettre le maintien des phosphorylations. Mais elle peut aussi

être mise en relation avec des résultats obtenus *in vitro*. En effet, nous avons constaté que lors de nos expériences de comblement de blessure que les cellules à l'arrière du front de migration, moins actives dans la migration, présentent un niveau de phosphorylation S892-893 quasi nul. Ainsi, il pourrait être considéré que les cellules métastatiques des poumons des souris ne sont également plus en migration et pourraient donc avoir perdu les phosphorylations S892-893 sur FAK. Ainsi, il serait intéressant de tester le niveau d'activation de PKC θ (T538) dans ces métastases.

L'implication de PKC θ dans la formation de métastases suggère qu'elle pourrait influencer les issues cliniques des patientes atteintes de CSTN. Cette hypothèse est corroborée par des données que nous avons récemment extraites d'Oncomine.

11.3. Implication de PKC θ dans les cancers du sein de patientes.

Nous constatons que l'expression de PKC θ (ARNm) est associée à une augmentation du grade des tumeurs. L'augmentation de l'expression de PKC θ est significative entre les tumeurs de grade 1 et celles de grade 3 (**Figure 35**). De plus, elle semble associée à une diminution de la survie des patientes. En effet, nous constatons que le niveau de PKC θ ou le nombre de copies du gène semble augmenté chez les patientes décédées à 5 ans mais également à 1 an, comparés à ceux de patientes encore en vie. Cet effet est retrouvé par plusieurs études indépendantes (**Figure 36**). Nous comptons mener des analyses statistiques à partir des données brutes afin de nous assurer de la significativité de cet effet. De plus, nous avons mis en place une collaboration avec des oncologues de l'Oncopôle de Toulouse afin d'avoir accès aux échantillons de patientes et mesurer cet effet de l'expression de PKC θ sur la survie des patientes. Si l'effet est bien significatif, nous l'associerons à l'article de la première étude et ce résultat appuiera l'implication de PKC θ dans la formation de métastases, les métastases étant à l'origine de la majorité des décès par cancer (Valastyan et Weinberg, 2011). De plus, nous comptons tester sur les tumeurs de patientes le niveau de phosphorylation de la FAK sur S892-893. Si une corrélation entre ce niveau et les issues

cliniques est observée, cela appuiera la pertinence clinique du mécanisme mis à jour dans des cellules en culture.

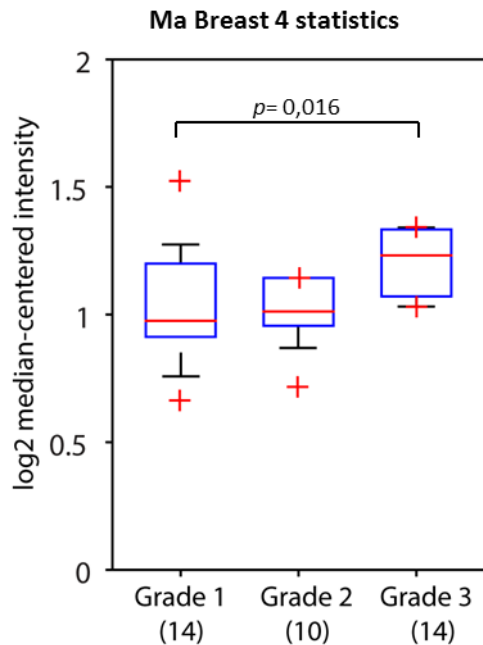


Figure 35. Grade de tumeurs de patientes de cancer du sein en fonction du niveau d'expression de PKCθ (ARNm). La différence est significative entre les grades 1 et 3. Graphe reproduit à partir des données extraites d'Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>).

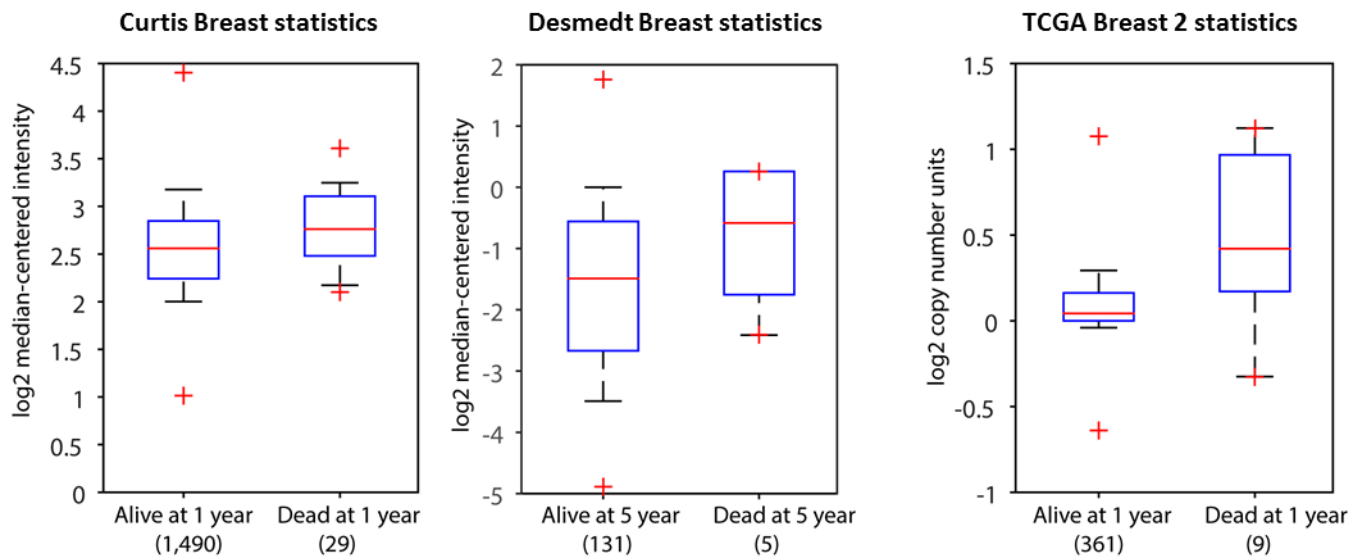


Figure 36. Survie à 1 an et 5 ans des patientes de cancer du sein en fonction du niveau d'expression de PKCθ (ARNm, deux graphes de gauche) ou du nombre de copies du gène *PRKCQ* (graphe de droite). Graphes reproduits à partir des données extraites d'Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>).

L'implication de PKC θ dans la formation de métastases *in vivo*, de même que les données d'Oncomine permettent de fortement renforcer l'hypothèse selon laquelle inhiber PKC θ est une option thérapeutique intéressante dans la lutte contre les CSTN.

Chapitre XII

PKC θ en tant que cible thérapeutique des CSTN ?

12.1. Faible toxicité.

Cibler PKC θ en thérapie contre les CSTN présenterait pour intérêt principal d'affecter la prolifération et l'invasion des cellules tumorales avec peu ou pas d'effets secondaires. En effet, comme mentionné en introduction, l'expression physiologique de PKC θ est restreinte à quelques types cellulaires et les souris KO PKC θ -/- sont fertiles et en bonne santé.

12.2. Inhibiteurs pharmacologiques.

Une thérapie CSTN visant à inhiber PKC θ pourrait bénéficier de recherches effectuées pour lutter contre des pathologies du système immunitaire. En effet, de par son rôle dans la régulation des lymphocytes T, PKC θ a été impliquée dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires mais également dans les mécanismes de rejet de greffes (Zhang et al. 2011). Ainsi, de nombreux groupes pharmaceutiques se sont activement penchés sur le développement d'inhibiteurs de PKC θ . La plupart de ces inhibiteurs fonctionnent en inhibant la liaison de l'ATP à la PKC θ . Le plus avancé est la sotrastaurine (AEB071) qui est en phase II d'essai clinique pour un traitement contre le psoriasis (Skvara et al., 2008), et, pour une thérapie visant à éviter le rejet de transplantations rénales (Budde et al., 2010 ; Friman et al., 2011). Les données au court terme montrent que cet inhibiteur est bien toléré par les patients. Toutefois, bien que cet inhibiteur agisse principalement sur PKC θ , il limite également les activités de PKC α et PKC β et dans une moindre mesure celles de PKC δ , ϵ et η . Ainsi, d'autres groupes ont cherché à développer des inhibiteurs plus spécifiques à PKC θ .

Jimenez et al. y sont parvenus en développant un composé (C27) capable d'inhiber très spécifiquement PKC θ sans affecter les autres PKCs (Jimenez et al., 2013). Dans le cadre d'une hypothétique thérapie contre les CSTN, il serait préférable d'utiliser un inhibiteur tel que le C27 ciblant spécifiquement PKC θ au vu des effets opposés joués par les PKCs dans la progression tumorale, en considérant par exemple le fait qu'une inhibition de PKC δ et PKC η pourrait avoir un effet positif sur la survie et la prolifération des cellules tumorales (Garg et al., 2014).

12.3. Cibler la voie PKC θ /FAK ?

Un autre élément à considérer est la fonction du système immunitaire dans la progression tumorale et l'implication de PKC θ dans ces processus, qui ne peut d'ailleurs pas être évaluée dans nos expériences menées sur des souris immunodéficientes. Il a été montré que PKC θ permet la différenciation des lymphocytes en Th2 et Th17 (Burkholder et al., 2014). Or un rôle promoteur de tumeurs a été attribué aux lymphocytes Th2, ce qui laisse penser qu'une inhibition de PKC θ pourrait, au-delà de son effet sur les cellules tumorales, limiter la progression tumorale en freinant l'action des Th2. Cependant, les lymphocytes Th17 également contrôlés par PKC θ peuvent jouer à la fois des rôles de promoteurs mais aussi d'inhibiteurs de tumeurs (Burkholder et al., 2014). Qui plus est, PKC θ a été impliquée dans les effets anti-tumoraux des Natural killers (cellules NK), des lymphocytes cytotoxiques (Anel et al., 2012). De ce fait, inhiber PKC θ pourrait également limiter les défenses immunitaires mises en place pour lutter contre la progression tumorale.

Afin de gagner en spécificité et de s'affranchir de ces effets potentiels sur le système immunitaire, les mécanismes moléculaires mis en lumière durant ma thèse pourraient être exploités. Ainsi, une inhibition des effets de PKC θ sur l'invasion pourrait passer par une inhibition de son interaction avec FAK. Ce type d'inhibiteur ciblant spécifiquement l'interaction de kinases et de leurs substrats ont déjà été développés pour plusieurs kinases (Bogoyevitch et Fairlie, 2007). Dans le cas de PKC θ , une inhibition de son interaction avec FAK présenterait un avantage par rapport aux inhibiteurs de l'activité catalytique. En effet, nous avons observé que le mutant de FAK non phosphorylable par PKC θ (FAK 892-893A) n'empêchent pas son effet sur l'ouverture de FAK. De même, bien que ce mutant limite fortement l'invasion induite par PKC θ CA, un niveau d'invasion résiduel persiste. Ainsi, il est

envisageable qu'une simple interaction entre les deux protéines puisse permettre un certain niveau d'ouverture donc d'activation de FAK permettant l'invasion des cellules tumorales. Par conséquent, utiliser des inhibiteurs empêchant l'interaction permettrait à la fois de limiter les effets de PKC θ passant par la phosphorylation sur les sérines S892-893 mais aussi ceux passant par la levée de l'auto-inhibition du domaine FERM de FAK. En supposant que ces mécanismes soient spécifiques aux cellules du cancer du sein, une telle thérapie ciblée permettrait bien de limiter les potentiels effets secondaires (notamment sur le système immunitaire).

Cependant, le désavantage de ce type de thérapies extrêmement ciblées est celui d'être particulièrement associées au développement de résistances.

12.4. Risques de résistances.

Les résistances aux thérapies ciblées peuvent survenir via des effets de sélection dans la population tumorale ou par des phénomènes de compensation au sein des cellules tumorales (Bozik et al., 2012). Pour évaluer ce risque dans notre cas, il pourrait être intéressant de connaître la proportion de cellules exprimant PKC θ dans les tumeurs mammaires de patientes et d'évaluer l'évolution spatio-temporelle de cette proportion. Mais pour essayer de s'en affranchir, il serait judicieux de combiner des inhibiteurs de PKC θ à d'autres thérapies ciblées. Par exemple, il pourrait être envisagé d'associer des inhibiteurs de PKC θ à des inhibiteurs du VEGF. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs du VEGF, qui sont actuellement testés contre les CSTN, permet de limiter l'angiogenèse. Cependant, Paéz-Ribes et al. ont montré qu'une telle inhibition pouvait aboutir à une adaptation de cellules tumorales par une augmentation de leurs capacités invasives, leur permettant de former des métastases même en l'absence d'angiogenèse (Paéz-Ribes et al., 2009). Aussi, à l'inverse, il peut être supposé qu'une inhibition de l'invasion de cellules tumorales nécessaire à leur migration jusqu'aux vaisseaux soit compensée par une augmentation des phénomènes d'angiogenèse. De ce fait, l'association d'un inhibiteur de PKC θ à un inhibiteur de VEGF pourrait, en ciblant deux voies différentes, limiter la dissémination métastatique des cellules tumorales mammaires et potentiellement améliorer le pronostic de patientes atteintes de CSTN.

CONCLUSION GENERALE.

L'objectif de ma thèse était de comprendre comment PKC θ contrôle l'invasion des cellules de cancers du sein. Aujourd'hui, nous sommes en mesure de dire que PKC θ contrôle positivement l'invasion de lignées CSTN *in vitro* et également la capacité de ces cellules à former des métastases *in vivo*. Nous montrons que ses effets sur l'invasion dépendent entièrement de FAK, en grande partie de sa capacité à la phosphoryler sur les sérines 892-893 et probablement à lever l'auto-inhibition de FAK. Les données extraites d'Oncomine semblent associer PKC θ aux issues cliniques des cancers du sein. Ainsi, mes travaux permettent de mieux définir PKC θ en tant cible thérapeutique potentielle contre les CSTN tout en mettant en lumière un mécanisme inédit de régulation directe de FAK et de l'invasion par la Protéine Kinase C θ (Figure 37).

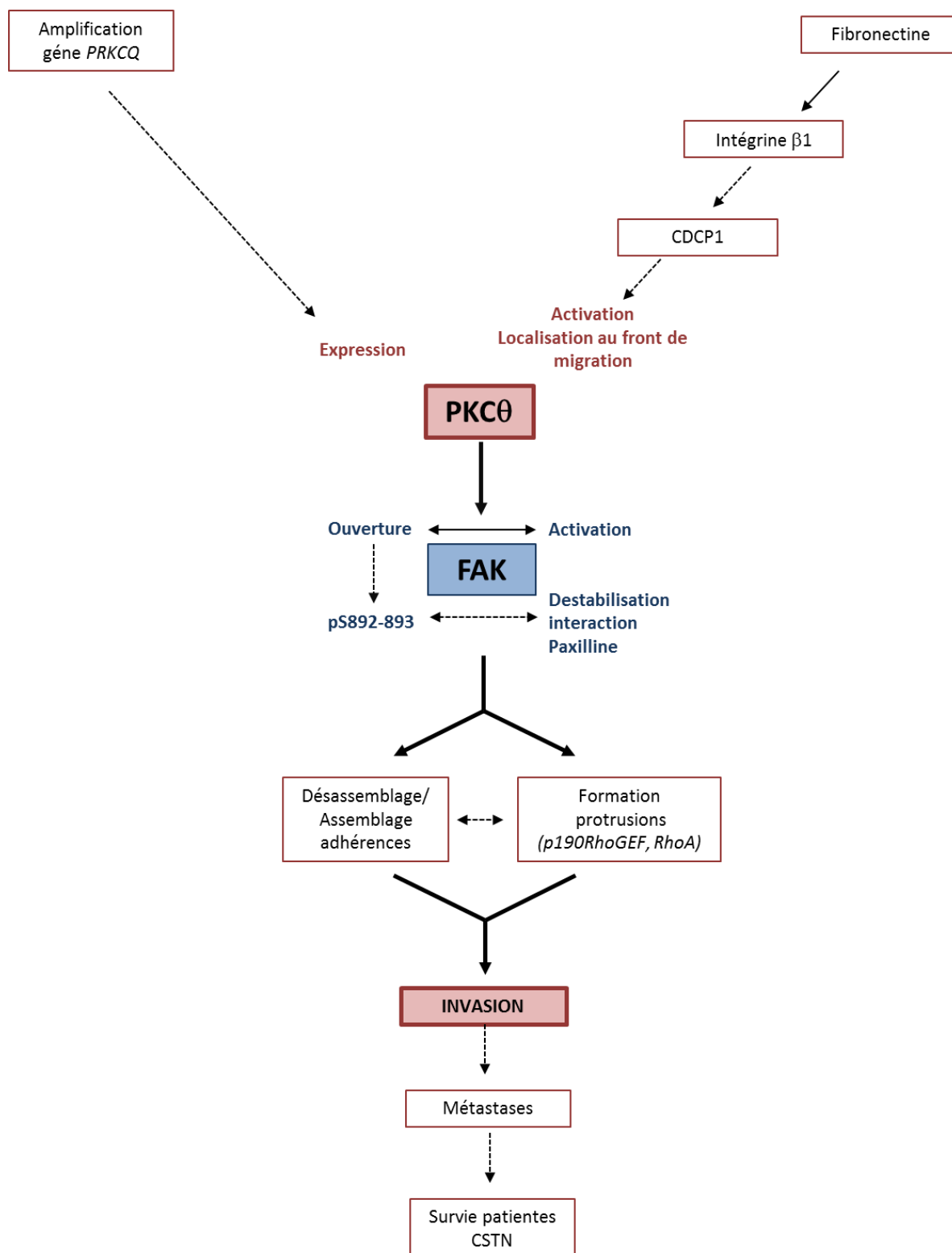


Figure 37. Conclusion générale: modèle du contrôle de l'invasion par la Protéine Kinase C thêta dans les cancers du sein. L'amplification du gène *PRKCQ* aboutit à la surexpression de PKCθ dans les cellules tumorales de CSTN. L'activation de CDCP1 en aval de l'intégrine β1 et de la fibronectine permet l'activation catalytique de PKCθ ainsi que sa localisation au front de cellules en migration. À ce niveau, PKCθ interagit avec FAK, permettant ainsi via son domaine V3, la levée de l'autoinhibition de FAK (ouverture). PKCθ phosphoryle également directement FAK sur les sérines 892-893. Ces phosphorylations déstabilisent l'interaction avec la paxilline, ce qui aboutit au désassemblage puis au réassemblage des adhérences. Cette déstabilisation favorise l'interaction de FAK avec p190RhoGEF, permettant la formation de nouvelles protrusions. L'effet de PKCθ sur l'ouverture FAK en dehors de sa capacité à la phosphoryler pourrait également participer au contrôle de la dynamique des adhérences. L'ensemble permet aux cellules tumorales de mieux explorer leur environnement, auquel elles s'accrochent et se décrochent rapidement, et augmente ainsi leurs capacités invasives et donc celles à former des métastases mettant en jeu la survie des patientes CSTN. Les relations clairement démontrées sont indiquées avec des traits pleins. Les relations restant à démontrer ou à préciser sont indiquées par des pointillés.

ABBREVIATIONS

AP-1 : activating protein 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNi: ARN interférent

ATP : adénosine tri-phosphate

BRCA1 : breast cancer one

Cdc42 : cell division control protein 42

CDCP1 : CUB domain-containing protein 1

cDNA : complementary DNA

CK : cytokératine

CSTN : cancer du sein triple-négatif

DAG : diacylglycérol

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

FAK : focal adhesion kinase

FAT : focal adhesion targetting domain

FERM : four point one ezrin radixin moesin domain

FGF : foetal growth factor

FISH : fluorescence in situ hybridization

FRET : fluorescence resonance energy transfer

GAP : GTPase activating protein

GDP : guanosine di-phosphate

GEF : guanine nucleotide exchange factor

GIST : Gastro-intestinal Stromal Tumor

GLK : Germinal center kinase-like kinase,

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

GST : glutathione S-transferase

GTP : guanosine tri-phosphate

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HGF : Hepatocyte growth factor

JAK : Janus kinase

KO : knock out

LCK : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

MEC : matrice extracellulaire

MMP : matrix metalloproteinase

MT1-MMP : membrane type 1 matrix metalloproteinase

mTOR : mammalian target of rapamycin

MTT: bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NES : nuclear export sequence

NF-kB :Nuclear factor-kB

NK : natural killer

NLS : nuclear localization sequences

PAR6 : partitioning defective 6

PDGF : Platelet-derived growth factor

PH : pleckstrin homology

PKC α : protéine kinase C α

PtdIns(4,5)P₂ : phosphatidyl inositide bi-phosphate

PYK2 : proline rich kinase 2

RE : récepteur aux estrogènes.

ROCK : rho associated protein kinase

RP : récepteur à la progestérone

S : sérine

SH3 : Src homology 3 domain

shRNA : short hairpin RNA

SI : synapse immunologique

siRNA : small interfering RNA

SPAK : Ste20-related proline-alanine-rich kinase

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

T : thréonine

TCR : T cell receptor

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TGF β : transforming growth factor β

VEGF : vascular endothelial growth factor

WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein

wt : wild type

Y : tyrosine

REFERENCES.

Abercrombie, M., J. E. Heaysman, and S. M. Pegrum. "The Locomotion of Fibroblasts in Culture. I. Movements of the Leading Edge." *Exp Cell Res* 59, no. 3 (Mar 1970): 393-8.

Alexander, N. R., K. M. Branch, A. Parekh, E. S. Clark, I. C. Iwueke, S. A. Guelcher, and A. M. Weaver. "Extracellular Matrix Rigidity Promotes Invadopodia Activity." *Curr Biol* 18, no. 17 (Sep 09 2008): 1295-9.

Allinen, M., R. Beroukhi, L. Cai, C. Brennan, J. Lahti-Domenici, H. Huang, D. Porter, et al. "Molecular Characterization of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer." *Cancer Cell* 6, no. 1 (Jul 2004): 17-32.

Anel, A., J. I. Aguiló, E. Catalan, J. Garaude, M. G. Rathore, J. Pardo, and M. Villalba. "Protein Kinase C-Theta (Pkc-Theta) in Natural Killer Cell Function and Anti-Tumor Immunity." *Front Immunol* 3 (2012): 187.

Arendt, L. M., J. A. Rudnick, P. J. Keller, and C. Kuperwasser. "Stroma in Breast Development and Disease." *Semin Cell Dev Biol* 21, no. 1 (Feb 2010): 11-8.

Arjonen, A., R. Kaukonen, and J. Ivaska. "Filopodia and Adhesion in Cancer Cell Motility." *Cell Adh Migr* 5, no. 5 (Sep-Oct 2011): 421-30.

Arold, S. T., M. K. Hoellerer, and M. E. Noble. "The Structural Basis of Localization and Signaling by the Focal Adhesion Targeting Domain." *Structure* 10, no. 3 (Mar 2002): 319-27.

Baier, G., D. Telford, L. Giampa, K. M. Coggeshall, G. Baier-Bitterlich, N. Isakov, and A. Altman. "Molecular Cloning and Characterization of Pkc Theta, a Novel Member of the Protein Kinase C (Pkc) Gene Family Expressed Predominantly in Hematopoietic Cells." *J Biol Chem* 268, no. 7 (Mar 05 1993): 4997-5004.

Beal, A. M., N. Anikeeva, R. Varma, T. O. Cameron, P. J. Norris, M. L. Dustin, and Y. Sykulev. "Protein Kinase C Theta Regulates Stability of the Peripheral Adhesion Ring Junction and Contributes to the Sensitivity of Target Cell Lysis by Ctl." *J Immunol* 181, no. 7 (Oct 01 2008): 4815-24.

Beierle, E. A., N. A. Massoll, J. Hartwich, E. V. Kurenova, V. M. Golubovskaya, W. G. Cance, P. McGrady, and W. B. London. "Focal Adhesion Kinase Expression in Human Neuroblastoma: Immunohistochemical and Real-Time Pcr Analyses." *Clin Cancer Res* 14, no. 11 (Jun 01 2008): 3299-305.

Belguise, K., S. Milord, F. Galtier, G. Moquet-Torcy, M. Piechaczyk, and D. Chalbos. "The Pkctheta Pathway Participates in the Aberrant Accumulation of Fra-1 Protein in Invasive Er-Negative Breast Cancer Cells." *Oncogene* 31, no. 47 (Nov 22 2012): 4889-97.

Belguise, K., and G. E. Sonenshein. "Pkctheta Promotes C-Rel-Driven Mammary Tumorigenesis in Mice and Humans by Repressing Estrogen Receptor Alpha Synthesis." *J Clin Invest* 117, no. 12 (Dec 2007): 4009-21.

Bijjan, K., C. Loughheed, J. Su, B. Xu, H. Yu, J. H. Wu, K. Riccio, and M. A. Alaoui-Jamali. "Targeting Focal Adhesion Turnover in Invasive Breast Cancer Cells by the Purine Derivative Reversine." *Br J Cancer* 109, no. 11 (Nov 26 2013): 2810-8.

Bill, R., and G. Christofori. "The Relevance of Emt in Breast Cancer Metastasis: Correlation or Causality?". *FEBS Lett* 589, no. 14 (Jun 22 2015): 1577-87.

Blay, P., A. Astudillo, J. M. Buesa, E. Campo, M. Abad, J. Garcia-Garcia, R. Miquel, et al. "Protein Kinase C Theta Is Highly Expressed in Gastrointestinal Stromal Tumors but Not in Other Mesenchymal Neoplasias." *Clin Cancer Res* 10, no. 12 Pt 1 (Jun 15 2004): 4089-95.

Bogoyevitch, M. A., and D. P. Fairlie. "A New Paradigm for Protein Kinase Inhibition: Blocking Phosphorylation without Directly Targeting Atp Binding." *Drug Discov Today* 12, no. 15-16 (Aug 2007): 622-33.

Bombonati, A., and D. C. Sgroi. "The Molecular Pathology of Breast Cancer Progression." *J Pathol* 223, no. 2 (Jan 2011): 307-17.

Bouchard, V., M. J. Demers, S. Thibodeau, V. Laquerre, N. Fujita, T. Tsuruo, J. F. Beaulieu, et al. "Fak/Src Signaling in Human Intestinal Epithelial Cell Survival and Anoikis: Differentiation State-Specific Uncoupling with the Pi3-K/Akt-1 and Mek/Erk Pathways." *J Cell Physiol* 212, no. 3 (Sep 2007): 717-28.

Bozic, I., B. Allen, and M. A. Nowak. "Dynamics of Targeted Cancer Therapy." *Trends Mol Med* 18, no. 6 (Jun 2012): 311-6.

Brabek, J., C. T. Mierke, D. Rosel, P. Vesely, and B. Fabry. "The Role of the Tissue Microenvironment in the Regulation of Cancer Cell Motility and Invasion." *Cell Commun Signal* 8 (Sep 07 2010): 22.

Brami-Cherrier, K., N. Gervasi, D. Arsenieva, K. Walkiewicz, M. C. Bouterin, A. Ortega, P. G. Leonard, et al. "Fak Dimerization Controls Its Kinase-Dependent Functions at Focal Adhesions." *EMBO J* 33, no. 4 (Feb 18 2014): 356-70.

Braren, R., H. Hu, Y. H. Kim, H. E. Beggs, L. F. Reichardt, and R. Wang. "Endothelial Fak Is Essential for Vascular Network Stability, Cell Survival, and Lamellipodial Formation." *J Cell Biol* 172, no. 1 (Jan 02 2006): 151-62.

Broussard, J. A., B. Rappaz, D. J. Webb, and C. M. Brown. "Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy as Demonstrated by Measuring the Activation of the Serine/Threonine Kinase Akt." *Nat Protoc* 8, no. 2 (Feb 2013): 265-81.

Budde, K., C. Sommerer, T. Becker, A. Asderakis, F. Pietruck, J. M. Grinyo, P. Rigotti, et al. "Sotrastaurin, a Novel Small Molecule Inhibiting Protein Kinase C: First Clinical Results in Renal-Transplant Recipients." *Am J Transplant* 10, no. 3 (Mar 2010): 571-81.

Burkholder, B., R. Y. Huang, R. Burgess, S. Luo, V. S. Jones, W. Zhang, Z. Q. Lv, et al. "Tumor-Induced Perturbations of Cytokines and Immune Cell Networks." *Biochim Biophys Acta* 1845, no. 2 (Apr 2014): 182-201.

Byerly, J., G. Halstead-Nussloch, K. Ito, I. Katsyov, and H. Y. Irie. "Prkcq Promotes Oncogenic Growth and Anoikis Resistance of a Subset of Triple-Negative Breast Cancer Cells." *Breast Cancer Res* 18, no. 1 (Sep 23 2016): 95.

Calalb, M. B., T. R. Polte, and S. K. Hanks. "Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Sites in the Catalytic Domain Regulates Kinase Activity: A Role for Src Family Kinases." *Mol Cell Biol* 15, no. 2 (Feb 1995): 954-63.

Cance, W. G., J. E. Harris, M. V. Iacocca, E. Roche, X. Yang, J. Chang, S. Simkins, and L. Xu. "Immunohistochemical Analyses of Focal Adhesion Kinase Expression in Benign and Malignant Human Breast and Colon Tissues: Correlation with Preinvasive and Invasive Phenotypes." *Clin Cancer Res* 6, no. 6 (Jun 2000): 2417-23.

Canel, M., P. Secades, J. P. Rodrigo, R. Cabanillas, A. Herrero, C. Suarez, and M. D. Chiara. "Overexpression of Focal Adhesion Kinase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Independent of Fak Gene Copy Number." *Clin Cancer Res* 12, no. 11 Pt 1 (Jun 01 2006): 3272-9.

Carragher, N. O., M. A. Westhoff, V. J. Fincham, M. D. Schaller, and M. C. Frame. "A Novel Role for Fak as a Protease-Targeting Adaptor Protein: Regulation by P42 Erk and Src." *Curr Biol* 13, no. 16 (Aug 19 2003): 1442-50.

Cary, L. A., D. C. Han, T. R. Polte, S. K. Hanks, and J. L. Guan. "Identification of P130cas as a Mediator of Focal Adhesion Kinase-Promoted Cell Migration." *J Cell Biol* 140, no. 1 (Jan 12 1998): 211-21.

Casar, B., I. Rimann, H. Kato, S. J. Shattil, J. P. Quigley, and E. I. Deryugina. "In Vivo Cleaved Cdc1 Promotes Early Tumor Dissemination Via Complexing with Activated Beta1 Integrin and Induction of Fak/Pi3k/Akt Motility Signaling." *Oncogene* 33, no. 2 (Jan 09 2014): 255-68.

Ceccarelli, D. F., H. K. Song, F. Poy, M. D. Schaller, and M. J. Eck. "Crystal Structure of the Ferm Domain of Focal Adhesion Kinase." *J Biol Chem* 281, no. 1 (Jan 06 2006): 252-9.

Chang, J. D., Y. Xu, M. K. Raychowdhury, and J. A. Ware. "Molecular Cloning and Expression of a Cdna Encoding a Novel Isoenzyme of Protein Kinase C (Npkc). A New Member of the Npkc Family Expressed in Skeletal Muscle, Megakaryoblastic Cells, and Platelets." *J Biol Chem* 268, no. 19 (Jul 05 1993): 14208-14.

Chen, S. Y., and H. C. Chen. "Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase (Fak) with Met Is Required for Fak to Promote Hepatocyte Growth Factor-Induced Cell Invasion." *Mol Cell Biol* 26, no. 13 (Jul 2006): 5155-67.

Chen, W. T., E. Hasegawa, T. Hasegawa, C. Weinstock, and K. M. Yamada. "Development of Cell Surface Linkage Complexes in Cultured Fibroblasts." *J Cell Biol* 100, no. 4 (Apr 1985): 1103-14.

Cheung, K. J., E. Gabrielson, Z. Werb, and A. J. Ewald. "Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program." *Cell* 155, no. 7 (Dec 19 2013): 1639-51.

Choi, C. H., B. A. Webb, M. S. Chimenti, M. P. Jacobson, and D. L. Barber. "Ph Sensing by Fak-His58 Regulates Focal Adhesion Remodeling." *J Cell Biol* 202, no. 6 (Sep 16 2013): 849-59.

Choi, C. K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L. A. Whitmore, A. Mogilner, and A. R. Horwitz. "Actin and Alpha-Actinin Orchestrate the Assembly and Maturation of Nascent Adhesions in a Myosin II Motor-Independent Manner." *Nat Cell Biol* 10, no. 9 (Sep 2008): 1039-50.

Choi, C. K., J. Zareno, M. A. Digman, E. Gratton, and A. R. Horwitz. "Cross-Correlated Fluctuation Analysis Reveals Phosphorylation-Regulated Paxillin-Fak Complexes in Nascent Adhesions." *Biophys J* 100, no. 3 (Feb 02 2011): 583-92.

Chuang, H. C., J. L. Lan, D. Y. Chen, C. Y. Yang, Y. M. Chen, J. P. Li, C. Y. Huang, et al. "The Kinase Glk Controls Autoimmunity and Nf-KappaB Signaling by Activating the Kinase Pkc-Theta in T Cells." *Nat Immunol* 12, no. 11 (Oct 09 2011): 1113-8.

Clark, A. G., and D. M. Vignjevic. "Modes of Cancer Cell Invasion and the Role of the Microenvironment." *Curr Opin Cell Biol* 36 (Oct 2015): 13-22.

Cooper, L. A., T. L. Shen, and J. L. Guan. "Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction." *Mol Cell Biol* 23, no. 22 (Nov 2003): 8030-41.

Corsi, J. M., E. Rouer, J. A. Girault, and H. Enslen. "Organization and Post-Transcriptional Processing of Focal Adhesion Kinase Gene." *BMC Genomics* 7 (Aug 04 2006): 198.

Czerwinski, R., A. Aulabaugh, R. M. Greco, S. Olland, K. Malakian, S. Wolfrom, L. Lin, et al. "Characterization of Protein Kinase C Theta Activation Loop Autophosphorylation and the Kinase Domain Catalytic Mechanism." *Biochemistry* 44, no. 28 (Jul 19 2005): 9563-73.

Damsky, C. H., K. A. Knudsen, D. Bradley, C. A. Buck, and A. F. Horwitz. "Distribution of the Cell Substratum Attachment (Csat) Antigen on Myogenic and Fibroblastic Cells in Culture." *J Cell Biol* 100, no. 5 (May 1985): 1528-39.

David, M., A. Macias, C. Moreno, A. Prieto, R. Martinez-Marmol, R. Vicente, T. Gonzalez, et al. "Protein Kinase C (Pkc) Activity Regulates Functional Effects of Kvbeta1.3 Subunit on Kv1.5 Channels: Identification of a Cardiac Kv1.5 Channelosome." *J Biol Chem* 287, no. 25 (Jun 15 2012): 21416-28.

Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, et al. "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence." *Clin Cancer Res* 13, no. 15 Pt 1 (Aug 01 2007): 4429-34.

Deramaudt, T. B., D. Dujardin, A. Hamadi, F. Noulet, K. Kolli, J. De Mey, K. Takeda, and P. Ronde. "Fak Phosphorylation at Tyr-925 Regulates Cross-Talk between Focal Adhesion Turnover and Cell Protrusion." *Mol Biol Cell* 22, no. 7 (Apr 2011): 964-75.

Desgrosellier, J. S., L. A. Barnes, D. J. Shields, M. Huang, S. K. Lau, N. Prevost, D. Tarin, S. J. Shattil, and D. A. Cheresh. "An Integrin Alpha(V)Beta(3)-C-Src Oncogenic Unit Promotes Anchorage-Independence and Tumor Progression." *Nat Med* 15, no. 10 (Oct 2009): 1163-9.

Desgrosellier, J. S., and D. A. Cheresh. "Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities." *Nat Rev Cancer* 10, no. 1 (Jan 2010): 9-22.

Diaz, L. K., M. Cristofanilli, X. Zhou, K. L. Welch, T. L. Smith, Y. Yang, N. Sneige, A. A. Sahin, and M. Z. Gilcrease. "Beta4 Integrin Subunit Gene Expression Correlates

with Tumor Size and Nuclear Grade in Early Breast Cancer." *Mod Pathol* 18, no. 9 (Sep 2005): 1165-75.

Disatnik, M. H., and T. A. Rando. "Integrin-Mediated Muscle Cell Spreading. The Role of Protein Kinase C in Outside-in and inside-out Signaling and Evidence of Integrin Cross-Talk." *J Biol Chem* 274, no. 45 (Nov 05 1999): 32486-92.

Doherty, J. T., F. L. Conlon, C. P. Mack, and J. M. Taylor. "Focal Adhesion Kinase Is Essential for Cardiac Looping and Multichamber Heart Formation." *Genesis* 48, no. 8 (Aug 2010): 492-504.

Drost, R., and J. Jonkers. "Opportunities and Hurdles in the Treatment of Brca1-Related Breast Cancer." *Oncogene* 33, no. 29 (Jul 17 2014): 3753-63.

Duensing, A., N. E. Joseph, F. Medeiros, F. Smith, J. L. Hornick, M. C. Heinrich, C. L. Corless, et al. "Protein Kinase C Theta (Pkctheta) Expression and Constitutive Activation in Gastrointestinal Stromal Tumors (Gists)." *Cancer Res* 64, no. 15 (Aug 01 2004): 5127-31.

Earley, S., and G. E. Plopper. "Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Promotes Extravasation of Breast Cancer Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 366, no. 2 (Feb 08 2008): 476-82.

Ezratty, E. J., M. A. Partridge, and G. G. Gundersen. "Microtubule-Induced Focal Adhesion Disassembly Is Mediated by Dynamin and Focal Adhesion Kinase." *Nat Cell Biol* 7, no. 6 (Jun 2005): 581-90.

Farmer, P., H. Bonnefoi, V. Becette, M. Tubiana-Hulin, P. Fumoleau, D. Larsimont, G. Macgrogan, et al. "Identification of Molecular Apocrine Breast Tumours by Microarray Analysis." *Oncogene* 24, no. 29 (Jul 07 2005): 4660-71.

Forrest, A. D., H. E. Beggs, L. F. Reichardt, J. L. Dupree, R. J. Colello, and B. Fuss. "Focal Adhesion Kinase (Fak): A Regulator of Cns Myelination." *J Neurosci Res* 87, no. 15 (Nov 15 2009): 3456-64.

Foulkes, W. D., I. E. Smith, and J. S. Reis-Filho. "Triple-Negative Breast Cancer." *N Engl J Med* 363, no. 20 (Nov 11 2010): 1938-48.

Frame, M. C., H. Patel, B. Serrels, D. Lietha, and M. J. Eck. "The Ferm Domain: Organizing the Structure and Function of Fak." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, no. 11 (Nov 2010): 802-14.

Freres, P., J. Collignon, C. Gennigens, I. Scagnol, A. Rorive, A. Barbeaux, P. A. Coucke, and G. Jerusalem. "[\"Triple Negative\" Breast Cancer]." *Rev Med Liege* 65, no. 3 (Mar 2010): 120-6.

Friedl, P., and S. Alexander. "Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity." *Cell* 147, no. 5 (Nov 23 2011): 992-1009.

Friedl, P., J. Locker, E. Sahai, and J. E. Segall. "Classifying Collective Cancer Cell Invasion." *Nat Cell Biol* 14, no. 8 (Aug 2012): 777-83.

Friedl, P., and K. Wolf. "Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms." *Nat Rev Cancer* 3, no. 5 (May 2003): 362-74.

Friedrichs, K., P. Ruiz, F. Franke, I. Gille, H. J. Terpe, and B. A. Imhof. "High Expression Level of Alpha 6 Integrin in Human Breast Carcinoma Is Correlated with Reduced Survival." *Cancer Res* 55, no. 4 (Feb 15 1995): 901-6.

Frisch, S. M., K. Vuori, E. Ruoslahti, and P. Y. Chan-Hui. "Control of Adhesion-Dependent Cell Survival by Focal Adhesion Kinase." *J Cell Biol* 134, no. 3 (Aug 1996): 793-9.

Fritz, G., C. Brachetti, F. Bahlmann, M. Schmidt, and B. Kaina. "Rho Gtpases in Human Breast Tumours: Expression and Mutation Analyses and Correlation with Clinical Parameters." *Br J Cancer* 87, no. 6 (Sep 09 2002): 635-44.

Fritz, R. D., and O. Pertz. "The Dynamics of Spatio-Temporal Rho Gtpase Signaling: Formation of Signaling Patterns." *F1000Res* 5 (2016).

Gabriel, B., A. zur Hausen, E. Stickeler, C. Dietz, G. Gitsch, D. C. Fischer, J. Bouda, C. Tempfer, and A. Hasenburg. "Weak Expression of Focal Adhesion Kinase (Pp125fak) in Patients with Cervical Cancer Is Associated with Poor Disease Outcome." *Clin Cancer Res* 12, no. 8 (Apr 15 2006): 2476-83.

Ganesan, P., S. Moulder, J. J. Lee, F. Janku, V. Valero, R. G. Zinner, A. Naing, et al. "Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated at Md Anderson Cancer Center in Phase I Trials: Improved Outcomes with Combination Chemotherapy and Targeted Agents." *Mol Cancer Ther* 13, no. 12 (Dec 2014): 3175-84.

Garg, R., L. G. Benedetti, M. B. Abera, H. Wang, M. Abba, and M. G. Kazanietz. "Protein Kinase C and Cancer: What We Know and What We Do Not." *Oncogene* 33, no. 45 (Nov 06 2014): 5225-37.

Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. "Integrin Signaling." *Science* 285, no. 5430 (Aug 13 1999): 1028-32.

Gilmore, A. P., and L. H. Romer. "Inhibition of Focal Adhesion Kinase (Fak) Signaling in Focal Adhesions Decreases Cell Motility and Proliferation." *Mol Biol Cell* 7, no. 8 (Aug 1996): 1209-24.

Gligorijevic, B., J. Wyckoff, H. Yamaguchi, Y. Wang, E. T. Roussos, and J. Condeelis. "N-Wasp-Mediated Invadopodium Formation Is Involved in Intravasation and Lung Metastasis of Mammary Tumors." *J Cell Sci* 125, no. Pt 3 (Feb 01 2012): 724-34.

Golubovskaya, V., A. Kaur, and W. Cance. "Cloning and Characterization of the Promoter Region of Human Focal Adhesion Kinase Gene: Nuclear Factor Kappa B and P53 Binding Sites." *Biochim Biophys Acta* 1678, no. 2-3 (May 25 2004): 111-25.

Golubovskaya, V. M. "Targeting Fak in Human Cancer: From Finding to First Clinical Trials." *Front Biosci (Landmark Ed)* 19 (Jan 01 2014): 687-706.

Golubovskaya, V. M., and W. G. Cance. "Focal Adhesion Kinase and P53 Signaling in Cancer Cells." *Int Rev Cytol* 263 (2007): 103-53.

Goni, G. M., C. Epifano, J. Boskovic, M. Camacho-Artacho, J. Zhou, A. Bronowska, M. T. Martin, et al. "Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Triggers Activation of Focal Adhesion Kinase by Inducing Clustering and Conformational Changes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, no. 31 (Aug 05 2014): E3177-86.

Grigera, P. R., E. D. Jeffery, K. H. Martin, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and J. T. Parsons. "Fak Phosphorylation Sites Mapped by Mass Spectrometry." *J Cell Sci* 118, no. Pt 21 (Nov 01 2005): 4931-5..

Griner, E. M., and M. G. Kazanietz. "Protein Kinase C and Other Diacylglycerol Effectors in Cancer." *Nat Rev Cancer* 7, no. 4 (Apr 2007): 281-94.

Grossoni, V. C., L. B. Todaro, M. G. Kazanietz, E. D. de Kier Joffe, and A. J. Urtreger. "Opposite Effects of Protein Kinase C Beta1 (Pkcbeta1) and Pkcepsilon in the Metastatic Potential of a Breast Cancer Murine Model." *Breast Cancer Res Treat* 118, no. 3 (Dec 2009): 469-80.

Guan, X. "Cancer Metastases: Challenges and Opportunities." *Acta Pharm Sin B* 5, no. 5 (Sep 2015): 402-18.

Gutierrez, C., and R. Schiff. "Her2: Biology, Detection, and Clinical Implications." *Arch Pathol Lab Med* 135, no. 1 (Jan 2011): 55-62.

Hagel, M., E. L. George, A. Kim, R. Tamimi, S. L. Opitz, C. E. Turner, A. Imamoto, and S. M. Thomas. "The Adaptor Protein Paxillin Is Essential for Normal Development in the Mouse and Is a Critical Transducer of Fibronectin Signaling." *Mol Cell Biol* 22, no. 3 (Feb 2002): 901-15.

Hage-Sleiman, R., A. B. Hamze, L. Reslan, H. Kobeissy, and G. Dbaiibo. "The Novel Pkctheta from Benchtop to Clinic." *J Immunol Res* 2015 (2015): 348798.

Hall, J. E., W. Fu, and M. D. Schaller. "Focal Adhesion Kinase: Exploring Fak Structure to Gain Insight into Function." *Int Rev Cell Mol Biol* 288 (2011): 185-225.

Hanahan, D., and R. A. Weinberg. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100, no. 1 (Jan 07 2000): 57-70.

Harburger, D. S., and D. A. Calderwood. "Integrin Signalling at a Glance." *J Cell Sci* 122, no. Pt 2 (Jan 15 2009): 159-63.

Harunaga, J. S., and K. M. Yamada. "Cell-Matrix Adhesions in 3d." *Matrix Biol* 30, no. 7-8 (Sep 2011): 363-8.

Hayashi, I., K. Vuori, and R. C. Liddington. "The Focal Adhesion Targeting (Fat) Region of Focal Adhesion Kinase Is a Four-Helix Bundle That Binds Paxillin." *Nat Struct Biol* 9, no. 2 (Feb 2002): 101-6.

Hayashi, K., and A. Altman. "Protein Kinase C Theta (Pkctheta): A Key Player in T Cell Life and Death." *Pharmacol Res* 55, no. 6 (Jun 2007): 537-44.

Heasman, S. J., and A. J. Ridley. "Mammalian Rho Gtpases: New Insights into Their Functions from in Vivo Studies." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, no. 9 (Sep 2008): 690-701.

Hecht, I., Y. Bar-El, F. Balmer, S. Natan, I. Tsarfaty, F. Schweitzer, and E. Ben-Jacob. "Tumor Invasion Optimization by Mesenchymal-Amoeboid Heterogeneity." *Sci Rep* 5 (May 27 2015): 10622.

Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, et al. "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets."

Herschkowitz, J. I., K. Simin, V. J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K. E. Rasmussen, et al. "Identification of Conserved Gene Expression Features between Murine Mammary Carcinoma Models and Human Breast Tumors." *Genome Biol* 8, no. 5 (2007): R76.

Heselmeyer-Haddad, K., L. Y. Berroa Garcia, A. Bradley, C. Ortiz-Melendez, W. J. Lee, R. Christensen, S. A. Prindiville, et al. "Single-Cell Genetic Analysis of Ductal Carcinoma in Situ and Invasive Breast Cancer Reveals Enormous Tumor Heterogeneity yet Conserved Genomic Imbalances and Gain of Myc During Progression." *Am J Pathol* 181, no. 5 (Nov 2012): 1807-22.

Hildebrand, J. D., M. D. Schaller, and J. T. Parsons. "Identification of Sequences Required for the Efficient Localization of the Focal Adhesion Kinase, Pp125fak, to Cellular Focal Adhesions." *J Cell Biol* 123, no. 4 (Nov 1993): 993-1005.

Hooper, J. D., A. Zijlstra, R. T. Aimes, H. Liang, G. F. Claassen, D. Tarin, J. E. Testa, and J. P. Quigley. "Subtractive Immunization Using Highly Metastatic Human Tumor Cells Identifies Sima135/Cdcp1, a 135 Kda Cell Surface Phosphorylated Glycoprotein Antigen." *Oncogene* 22, no. 12 (Mar 27 2003): 1783-94.

Horowitz, J. C., D. S. Rogers, V. Sharma, R. Vittal, E. S. White, Z. Cui, and V. J. Thannickal. "Combinatorial Activation of Fak and Akt by Transforming Growth Factor-Beta1 Confers an Anoikis-Resistant Phenotype to Myofibroblasts." *Cell Signal* 19, no. 4 (Apr 2007): 761-71.

Horton, E. R., A. Byron, J. A. Askari, D. H. Ng, A. Millon-Fremillon, J. Robertson, E. J. Koper, et al. "Definition of a Consensus Integrin Adhesome and Its Dynamics During Adhesion Complex Assembly and Disassembly." *Nat Cell Biol* 17, no. 12 (Dec 2015): 1577-87.

Hsia, D. A., S. K. Mitra, C. R. Hauck, D. N. Streblow, J. A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, et al. "Differential Regulation of Cell Motility and Invasion by Fak." *J Cell Biol* 160, no. 5 (Mar 03 2003): 753-67.

Hu, Y. L., S. Lu, K. W. Szeto, J. Sun, Y. Wang, J. C. Lasheras, and S. Chien. "Fak and Paxillin Dynamics at Focal Adhesions in the Protrusions of Migrating Cells." *Sci Rep* 4 (Aug 12 2014): 6024.

Huttenlocher, A., and A. R. Horwitz. "Integrins in Cell Migration." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, no. 9 (Sep 01 2011): a005074.

Hynes, R. O. "The Emergence of Integrins: A Personal and Historical Perspective." *Matrix Biol* 23, no. 6 (Oct 2004): 333-40.

———. "The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Science* 326, no. 5957 (Nov 27 2009): 1216-9.

Ilic, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, et al. "Reduced Cell Motility and Enhanced Focal Adhesion Contact Formation in Cells from Fak-Deficient Mice." *Nature* 377, no. 6549 (Oct 12 1995): 539-44.

Ilina, O., and P. Friedl. "Mechanisms of Collective Cell Migration at a Glance." *J Cell Sci* 122, no. Pt 18 (Sep 15 2009): 3203-8.

Inoue, M., A. Kishimoto, Y. Takai, and Y. Nishizuka. "Studies on a Cyclic Nucleotide-Independent Protein Kinase and Its Proenzyme in Mammalian Tissues. Ii.

Proenzyme and Its Activation by Calcium-Dependent Protease from Rat Brain." *J Biol Chem* 252, no. 21 (Nov 10 1977): 7610-6.

Insua-Rodriguez, J., and T. Oskarsson. "The Extracellular Matrix in Breast Cancer." *Adv Drug Deliv Rev* 97 (Feb 01 2016): 41-55.

Itoh, R. E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. "Activation of Rac and Cdc42 Video Imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based Single-Molecule Probes in the Membrane of Living Cells." *Mol Cell Biol* 22, no. 18 (Sep 2002): 6582-91.

Izaguirre, G., L. Aguirre, Y. P. Hu, H. Y. Lee, D. D. Schlaepfer, B. J. Aneskievich, and B. Haimovich. "The Cytoskeletal/Non-Muscle Isoform of Alpha-Actinin Is Phosphorylated on Its Actin-Binding Domain by the Focal Adhesion Kinase." *J Biol Chem* 276, no. 31 (Aug 03 2001): 28676-85.

Jacamo, R., X. Jiang, J. A. Lunn, and E. Rozengurt. "Fak Phosphorylation at Ser-843 Inhibits Tyr-397 Phosphorylation, Cell Spreading and Migration." *J Cell Physiol* 210, no. 2 (Feb 2007): 436-44.

Jacamo, R. O., and E. Rozengurt. "A Truncated Fak Lacking the Ferm Domain Displays High Catalytic Activity but Retains Responsiveness to Adhesion-Mediated Signals." *Biochem Biophys Res Commun* 334, no. 4 (Sep 09 2005): 1299-304.

Jacquemet, G., H. Hamidi, and J. Ivaska. "Filopodia in Cell Adhesion, 3d Migration and Cancer Cell Invasion." *Curr Opin Cell Biol* 36 (Oct 2015): 23-31.

Jain, K., and A. Basu. "Protein Kinase C-Epsilon Promotes Emt in Breast Cancer." *Breast Cancer (Auckl)* 8 (2014): 61-7.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. "Global Cancer Statistics." *CA Cancer J Clin* 61, no. 2 (Mar-Apr 2011): 69-90.

Jensen, E. V., and E. R. DeSombre. "Estrogen-Receptor Interaction." *Science* 182, no. 4108 (Oct 12 1973): 126-34.

Jin, X., and P. Mu. "Targeting Breast Cancer Metastasis." *Breast Cancer (Auckl)* 9, no. Suppl 1 (2015): 23-34.

Johnson, M. S., N. Lu, K. Denessiouk, J. Heino, and D. Gullberg. "Integrins During Evolution: Evolutionary Trees and Model Organisms." *Biochim Biophys Acta* 1788, no. 4 (Apr 2009): 779-89.

Jovanovic, J., J. A. Ronneberg, J. Tost, and V. Kristensen. "The Epigenetics of Breast Cancer." *Mol Oncol* 4, no. 3 (Jun 2010): 242-54.

Kadare, G., N. Gervasi, K. Bami-Cherrier, H. Blockus, S. El Messari, S. T. Arold, and J. A. Girault. "Conformational Dynamics of the Focal Adhesion Targeting Domain Control Specific Functions of Focal Adhesion Kinase in Cells." *J Biol Chem* 290, no. 1 (Jan 02 2015): 478-91.

Kalimutho, M., K. Parsons, D. Mittal, J. A. Lopez, S. Srihari, and K. K. Khanna. "Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease." *Trends Pharmacol Sci* 36, no. 12 (Dec 2015): 822-46.

Kallergi, G., M. A. Papadaki, E. Politaki, D. Mavroudis, V. Georgoulas, and S. Agelaki. "Epithelial to Mesenchymal Transition Markers Expressed in Circulating Tumour Cells of Early and Metastatic Breast Cancer Patients." *Breast Cancer Res* 13, no. 3 (Jun 10 2011): R59.

Kang, G. H., A. Srivastava, Y. E. Kim, H. J. Park, C. K. Park, T. S. Sohn, S. Kim, D. Y. Kang, and K. M. Kim. "Dog1 and Pkc-Theta Are Useful in the Diagnosis of Kit-Negative Gastrointestinal Stromal Tumors." *Mod Pathol* 24, no. 6 (Jun 2011): 866-75.

Kang, J. H., R. Toita, C. W. Kim, and Y. Katayama. "Protein Kinase C (Pkc) Isozyme-Specific Substrates and Their Design." *Biotechnol Adv* 30, no. 6 (Nov-Dec 2012): 1662-72.

Kang, Y., P. M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S. M. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T. A. Guise, and J. Massague. "A Multigenic Program Mediating Breast Cancer Metastasis to Bone." *Cancer Cell* 3, no. 6 (Jun 2003): 537-49.

Kanner, S. B., A. B. Reynolds, R. R. Vines, and J. T. Parsons. "Monoclonal Antibodies to Individual Tyrosine-Phosphorylated Protein Substrates of Oncogene-Encoded Tyrosine Kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, no. 9 (May 1990): 3328-32.

- Karginov, A. V., F. Ding, P. Kota, N. V. Dokholyan, and K. M. Hahn. "Engineered Allosteric Activation of Kinases in Living Cells." *Nat Biotechnol* 28, no. 7 (Jul 2010): 743-7.
- Karginov, A. V., Y. Zou, D. Shirvanyants, P. Kota, N. V. Dokholyan, D. D. Young, K. M. Hahn, and A. Deiters. "Light Regulation of Protein Dimerization and Kinase Activity in Living Cells Using Photocaged Rapamycin and Engineered Fkbp." *J Am Chem Soc* 133, no. 3 (Jan 26 2011): 420-3.
- Kaupilla, S., F. Stenback, J. Risteli, A. Jukkola, and L. Risteli. "Aberrant Type I and Type Iii Collagen Gene Expression in Human Breast Cancer in Vivo." *J Pathol* 186, no. 3 (Nov 1998): 262-8.
- Kim, J., S. H. Thorne, L. Sun, B. Huang, and D. Mochly-Rosen. "Sustained Inhibition of Pkcalpha Reduces Intravasation and Lung Seeding During Mammary Tumor Metastasis in an in Vivo Mouse Model." *Oncogene* 30, no. 3 (Jan 20 2011): 323-33.
- Kim, S. J., J. S. Kim, E. S. Park, J. S. Lee, Q. Lin, R. R. Langley, M. Maya, et al. "Astrocytes Upregulate Survival Genes in Tumor Cells and Induce Protection from Chemotherapy." *Neoplasia* 13, no. 3 (Mar 2011): 286-98.
- King, C. R., M. H. Kraus, and S. A. Aaronson. "Amplification of a Novel V-ErbB-Related Gene in a Human Mammary Carcinoma." *Science* 229, no. 4717 (Sep 06 1985): 974-6.
- Kishimoto, T. K., K. O'Connor, A. Lee, T. M. Roberts, and T. A. Springer. "Cloning of the Beta Subunit of the Leukocyte Adhesion Proteins: Homology to an Extracellular Matrix Receptor Defines a Novel Supergene Family." *Cell* 48, no. 4 (Feb 27 1987): 681-90.
- Klumpp, D., R. E. Horch, U. Kneser, and J. P. Beier. "Engineering Skeletal Muscle Tissue--New Perspectives in Vitro and in Vivo." *J Cell Mol Med* 14, no. 11 (Nov 2010): 2622-9.
- Kong, K. F., T. Yokosuka, A. J. Canonigo-Balancio, N. Isakov, T. Saito, and A. Altman. "A Motif in the V3 Domain of the Kinase Pkc-Theta Determines Its

Localization in the Immunological Synapse and Functions in T Cells Via Association with Cd28." *Nat Immunol* 12, no. 11 (Oct 02 2011): 1105-12.

Kramer, N., A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschlager, and H. Dolznig. "In Vitro Cell Migration and Invasion Assays." *Mutat Res* 752, no. 1 (Jan-Mar 2013): 10-24.

Krause, M., and A. Gautreau. "Steering Cell Migration: Lamellipodium Dynamics and the Regulation of Directional Persistence." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, no. 9 (Sep 2014): 577-90.

Kubow, K. E., and A. R. Horwitz. "Reducing Background Fluorescence Reveals Adhesions in 3d Matrices." *Nat Cell Biol* 13, no. 1 (Jan 2011): 3-5; author reply 5-7.

Kurokawa, K., and M. Matsuda. "Localized Rhoa Activation as a Requirement for the Induction of Membrane Ruffling." *Mol Biol Cell* 16, no. 9 (Sep 2005): 4294-303.

Kuukasjarvi, T., R. Karhu, M. Tanner, M. Kahkonen, A. Schaffer, N. Nupponen, S. Pennanen, et al. "Genetic Heterogeneity and Clonal Evolution Underlying Development of Asynchronous Metastasis in Human Breast Cancer." *Cancer Res* 57, no. 8 (Apr 15 1997): 1597-604.

Lark, A. L., C. A. Livasy, L. Dressler, D. T. Moore, R. C. Millikan, J. Geradts, M. Iacocca, et al. "High Focal Adhesion Kinase Expression in Invasive Breast Carcinomas Is Associated with an Aggressive Phenotype." *Mod Pathol* 18, no. 10 (Oct 2005): 1289-94.

Lawson, C., and D. D. Schlaepfer. "Integrin Adhesions: Who's on First? What's on Second? Connections between Fak and Talin." *Cell Adh Migr* 6, no. 4 (Jul-Aug 2012): 302-6.

———. "Phocal Adhesion Kinase Regulation Is on a Firm Foundation." *J Cell Biol* 202, no. 6 (Sep 16 2013): 833-6.

Le Boeuf, F., F. Houle, M. Sussman, and J. Huot. "Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (Fak) on Ser732 Is Induced by Rho-Dependent Kinase and Is Essential for Proline-Rich Tyrosine Kinase-2-Mediated Phosphorylation of Fak on

Tyr407 in Response to Vascular Endothelial Growth Factor." *Mol Biol Cell* 17, no. 8 (Aug 2006): 3508-20.

Lee, B. Y., P. Timpson, L. G. Horvath, and R. J. Daly. "Fak Signaling in Human Cancer as a Target for Therapeutics." *Pharmacol Ther* 146 (Feb 2015): 132-49.

Lee, F. Y., Y. Y. Zhen, C. M. Yuen, R. Fan, Y. T. Chen, J. J. Sheu, Y. L. Chen, et al. "The Mtor-Fak Mechanotransduction Signaling Axis for Focal Adhesion Maturation and Cell Proliferation." *Am J Transl Res* 9, no. 4 (2017): 1603-17.

Lehmann, B. D., J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. B. Chakravarthy, Y. Shyr, and J. A. Pietenpol. "Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies." *J Clin Invest* 121, no. 7 (Jul 2011): 2750-67.

Letschka, T., V. Kollmann, C. Pfeifhofer-Obermair, C. Lutz-Nicoladoni, G. J. Obermair, F. Fresser, M. Leitges, et al. "Pkc-Theta Selectively Controls the Adhesion-Stimulating Molecule Rap1." *Blood* 112, no. 12 (Dec 01 2008): 4617-27.

Levental, K. R., H. Yu, L. Kass, J. N. Lakins, M. Egeblad, J. T. Erler, S. F. Fong, et al. "Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling." *Cell* 139, no. 5 (Nov 25 2009): 891-906.

Li, H., K. Peyrolier, G. Kilic, and C. Brakebusch. "Rho Gtpases and Cancer." *Biofactors* 40, no. 2 (Mar-Apr 2014): 226-35.

Li, Y., J. Hu, R. Vita, B. Sun, H. Tabata, and A. Altman. "Spak Kinase Is a Substrate and Target of Pkctheta in T-Cell Receptor-Induced Ap-1 Activation Pathway." *EMBO J* 23, no. 5 (Mar 10 2004): 1112-22.

Li, Y., T. J. Soos, X. Li, J. Wu, M. Degennaro, X. Sun, D. R. Littman, M. J. Birnbaum, and R. D. Polakiewicz. "Protein Kinase C Theta Inhibits Insulin Signaling by Phosphorylating Irs1 at Ser(1101)." *J Biol Chem* 279, no. 44 (Oct 29 2004): 45304-7.

Lietha, D., X. Cai, D. F. Ceccarelli, Y. Li, M. D. Schaller, and M. J. Eck. "Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase." *Cell* 129, no. 6 (Jun 15 2007): 1177-87.

Lim, S. T., D. Mikolon, D. G. Stupack, and D. D. Schlaepfer. "Ferm Control of Fak Function: Implications for Cancer Therapy." *Cell Cycle* 7, no. 15 (Aug 2008): 2306-14.

Lim, Y., S. T. Lim, A. Tomar, M. Gardel, J. A. Bernard-Trifilo, X. L. Chen, S. A. Uryu, et al. "Pyk2 and Fak Connections to P190rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulate Rhoa Activity, Focal Adhesion Formation, and Cell Motility." *J Cell Biol* 180, no. 1 (Jan 14 2008): 187-203.

Lin, E. Y., and J. W. Pollard. "Tumor-Associated Macrophages Press the Angiogenic Switch in Breast Cancer." *Cancer Res* 67, no. 11 (Jun 01 2007): 5064-6.

Liu, Y., C. Graham, A. Li, R. J. Fisher, and S. Shaw. "Phosphorylation of the Protein Kinase C-Theta Activation Loop and Hydrophobic Motif Regulates Its Kinase Activity, but Only Activation Loop Phosphorylation Is Critical to in Vivo Nuclear-Factor-Kappab Induction." *Biochem J* 361, no. Pt 2 (Jan 15 2002): 255-65.

Liu, Y., S. Witte, Y. C. Liu, M. Doyle, C. Elly, and A. Altman. "Regulation of Protein Kinase Ctheta Function During T Cell Activation by Lck-Mediated Tyrosine Phosphorylation." *J Biol Chem* 275, no. 5 (Feb 04 2000): 3603-9.

Lloyd-Lewis, B., O. B. Harris, C. J. Watson, and F. M. Davis. "Mammary Stem Cells: Premise, Properties, and Perspectives." *Trends Cell Biol* (May 06 2017).

Lo, C. M., H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. "Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate." *Biophys J* 79, no. 1 (Jul 2000): 144-52.

Lohmer, L. L., L. C. Kelley, E. J. Hagedorn, and D. R. Sherwood. "Invadopodia and Basement Membrane Invasion in Vivo." *Cell Adh Migr* 8, no. 3 (2014): 246-55.

Loi, S., S. Michiels, R. Salgado, N. Sirtaine, V. Jose, D. Fumagalli, P. L. Kellokumpu-Lehtinen, et al. "Tumor Infiltrating Lymphocytes Are Prognostic in Triple Negative Breast Cancer and Predictive for Trastuzumab Benefit in Early Breast Cancer: Results from the Finher Trial." *Ann Oncol* 25, no. 8 (Aug 2014): 1544-50.

Lu, D., U. Sivaprasad, J. Huang, E. Shankar, S. Morrow, and A. Basu. "Protein Kinase C-Epsilon Protects MCF-7 Cells from TNF-Mediated Cell Death by Inhibiting Bax Translocation." *Apoptosis* 12, no. 10 (Oct 2007): 1893-900.

Lu, P., V. M. Weaver, and Z. Werb. "The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression." *J Cell Biol* 196, no. 4 (Feb 20 2012): 395-406.

Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, et al. "Coordination of Rho GTPase Activities During Cell Protrusion." *Nature* 461, no. 7260 (Sep 03 2009): 99-103.

Machesky, L. M. "Lamellipodia and Filopodia in Metastasis and Invasion." *FEBS Lett* 582, no. 14 (Jun 18 2008): 2102-11.

Madaro, L., V. Marrocco, P. Fiore, P. Aulino, P. Smeriglio, S. Adamo, M. Molinaro, and M. Bouche. "PKC θ Signaling Is Required for Myoblast Fusion by Regulating the Expression of Caveolin-3 and β 1 Integrin Upstream Focal Adhesion Kinase." *Mol Biol Cell* 22, no. 8 (Apr 15 2011): 1409-19.

Martelotto, L. G., C. K. Ng, S. Piscuoglio, B. Weigelt, and J. S. Reis-Filho. "Breast Cancer Intra-Tumor Heterogeneity." *Breast Cancer Res* 16, no. 3 (May 20 2014): 210.

Matsumoto, R., D. Wang, M. Blonska, H. Li, M. Kobayashi, B. Pappu, Y. Chen, D. Wang, and X. Lin. "Phosphorylation of CARMA1 Plays a Critical Role in T Cell Receptor-Mediated NF- κ B Activation." *Immunity* 23, no. 6 (Dec 2005): 575-85.

Mayor, R., and S. Etienne-Manneville. "The Front and Rear of Collective Cell Migration." *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, no. 2 (Feb 2016): 97-109.

McDaniel, S. M., K. K. Rumer, S. L. Biroc, R. P. Metz, M. Singh, W. Porter, and P. Schedin. "Remodeling of the Mammary Microenvironment after Lactation Promotes Breast Tumor Cell Metastasis." *Am J Pathol* 168, no. 2 (Feb 2006): 608-20.

Messina, G., S. Biressi, S. Monteverde, A. Magli, M. Cassano, L. Perani, E. Roncaglia, et al. "Nfix Regulates Fetal-Specific Transcription in Developing Skeletal Muscle." *Cell* 140, no. 4 (Feb 19 2010): 554-66.

Michalczyk, I., A. F. Sikorski, L. Kotula, R. P. Junghans, and P. M. Dubielecka. "The Emerging Role of Protein Kinase C θ in Cytoskeletal Signaling." *J Leukoc Biol* 93, no. 3 (Mar 2013): 319-27.

Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. "Wave, a Novel Wasp-Family Protein Involved in Actin Reorganization Induced by Rac." *EMBO J* 17, no. 23 (Dec 01 1998): 6932-41.

Minn, A. J., G. P. Gupta, P. M. Siegel, P. D. Bos, W. Shu, D. D. Giri, A. Viale, et al. "Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to Lung." *Nature* 436, no. 7050 (Jul 28 2005): 518-24.

Mitra, S. K., D. A. Hanson, and D. D. Schlaepfer. "Focal Adhesion Kinase: In Command and Control of Cell Motility." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, no. 1 (Jan 2005): 56-68.

Mochly-Rosen, D., K. Das, and K. V. Grimes. "Protein Kinase C, an Elusive Therapeutic Target?" *Nat Rev Drug Discov* 11, no. 12 (Dec 2012): 937-57.

Motegi, A., S. Sakurai, H. Nakayama, T. Sano, T. Oyama, and T. Nakajima. "Pkc θ , a Novel Immunohistochemical Marker for Gastrointestinal Stromal Tumors (Gist), Especially Useful for Identifying Kit-Negative Tumors." *Pathol Int* 55, no. 3 (Mar 2005): 106-12.

Murphy, D. A., and S. A. Courtneidge. "The 'Ins' and 'Outs' of Podosomes and Invadopodia: Characteristics, Formation and Function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, no. 7 (Jun 23 2011): 413-26.

Nader, G. P., E. J. Ezratty, and G. G. Gundersen. "Fak, Talin and Pipkigamma Regulate Endocytosed Integrin Activation to Polarize Focal Adhesion Assembly." *Nat Cell Biol* 18, no. 5 (May 2016): 491-503.

Nagano, M., D. Hoshino, N. Koshikawa, T. Akizawa, and M. Seiki. "Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration." *Int J Cell Biol* 2012 (2012): 310616.

Nagy, T., H. Wei, T. L. Shen, X. Peng, C. C. Liang, B. Gan, and J. L. Guan. "Mammary Epithelial-Specific Deletion of the Focal Adhesion Kinase Gene Leads to

Severe Lobulo-Alveolar Hypoplasia and Secretory Immaturity of the Murine Mammary Gland." *J Biol Chem* 282, no. 43 (Oct 26 2007): 31766-76.

Nahta, R., and F. J. Esteva. "Her2 Therapy: Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance." *Breast Cancer Res* 8, no. 6 (2006): 215.

Nahta, R., M. C. Hung, and F. J. Esteva. "The Her-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells." *Cancer Res* 64, no. 7 (Apr 01 2004): 2343-6.

Nath, P. R., and N. Isakov. "Pkctheta-Regulated Signalling in Health and Disease." *Biochem Soc Trans* 42, no. 6 (Dec 2014): 1484-9.

Nielsen, T. O., F. D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, et al. "Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma." *Clin Cancer Res* 10, no. 16 (Aug 15 2004): 5367-74.

Nobes, C. D., and A. Hall. "Rho, Rac, and Cdc42 Gtpases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia." *Cell* 81, no. 1 (Apr 07 1995): 53-62.

Ohta, R., Y. Yamashita, A. Taketomi, D. Kitagawa, Y. Kuroda, S. Itoh, S. Aishima, and Y. Maehara. "Reduced Expression of Focal Adhesion Kinase in Intrahepatic Cholangiocarcinoma Is Associated with Poor Tumor Differentiation." *Oncology* 71, no. 5-6 (2006): 417-22.

Osada, S., K. Mizuno, T. C. Saido, K. Suzuki, T. Kuroki, and S. Ohno. "A New Member of the Protein Kinase C Family, Npkc Theta, Predominantly Expressed in Skeletal Muscle." *Mol Cell Biol* 12, no. 9 (Sep 1992): 3930-8.

Oskarsson, T. "Extracellular Matrix Components in Breast Cancer Progression and Metastasis." *Breast* 22 Suppl 2 (Aug 2013): S66-72.

Ou, W. B., M. J. Zhu, G. D. Demetri, C. D. Fletcher, and J. A. Fletcher. "Protein Kinase C-Theta Regulates Kit Expression and Proliferation in Gastrointestinal Stromal Tumors." *Oncogene* 27, no. 42 (Sep 18 2008): 5624-34.

Owen, K. A., F. J. Pixley, K. S. Thomas, M. Vicente-Manzanares, B. J. Ray, A. F. Horwitz, J. T. Parsons, et al. "Regulation of Lamellipodial Persistence, Adhesion Turnover, and Motility in Macrophages by Focal Adhesion Kinase." *J Cell Biol* 179, no. 6 (Dec 17 2007): 1275-87.

Pan, L., Y. Zhao, Z. Yuan, and G. Qin. "Research Advances on Structure and Biological Functions of Integrins." *Springerplus* 5, no. 1 (2016): 1094.

Pan, Q., L. W. Bao, C. G. Kleer, M. S. Sabel, K. A. Griffith, T. N. Teknos, and S. D. Merajver. "Protein Kinase C Epsilon Is a Predictive Biomarker of Aggressive Breast Cancer and a Validated Target for Rna Interference Anticancer Therapy." *Cancer Res* 65, no. 18 (Sep 15 2005): 8366-71.

Pandya, P., J. L. Orgaz, and V. Sanz-Moreno. "Modes of Invasion During Tumour Dissemination." *Mol Oncol* 11, no. 1 (Jan 2017): 5-27.

Papusheva, E., F. Mello de Queiroz, J. Dalous, Y. Han, A. Esposito, E. A. Jares-Erijmanxa, T. M. Jovin, and G. Bunt. "Dynamic Conformational Changes in the Ferm Domain of Fak Are Involved in Focal-Adhesion Behavior During Cell Spreading and Motility." *J Cell Sci* 122, no. Pt 5 (Mar 01 2009): 656-66.

Pareja, F., F. C. Geyer, C. Marchio, K. A. Burke, B. Weigelt, and J. S. Reis-Filho. "Triple-Negative Breast Cancer: The Importance of Molecular and Histologic Subtyping, and Recognition of Low-Grade Variants." *NPJ Breast Cancer* 2 (2016): 16036.

Parri, M., and P. Chiarugi. "Rac and Rho Gtpases in Cancer Cell Motility Control." *Cell Commun Signal* 8 (Sep 07 2010): 23.

Parsons, J. T., A. R. Horwitz, and M. A. Schwartz. "Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, no. 9 (Sep 2010): 633-43.

Parsons, M., and J. C. Adams. "Rac Regulates the Interaction of Fascin with Protein

Paz, H., N. Pathak, and J. Yang. "Invading One Step at a Time: The Role of Invadopodia in Tumor Metastasis." *Oncogene* 33, no. 33 (Aug 14 2014): 4193-202.

Pellegrin, S., and H. Mellor. "The Rho Family Gtpase Rif Induces Filopodia through Mdia2." *Curr Biol* 15, no. 2 (Jan 26 2005): 129-33.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, et al. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours." *Nature* 406, no. 6797 (Aug 17 2000): 747-52.

Pertz, O., L. Hodgson, R. L. Klemke, and K. M. Hahn. "Spatiotemporal Dynamics of Rhoa Activity in Migrating Cells." *Nature* 440, no. 7087 (Apr 20 2006): 1069-72.

Petrie, R. J., A. D. Doyle, and K. M. Yamada. "Random Versus Directionally Persistent Cell Migration." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, no. 8 (Aug 2009): 538-49.

Petrie, R. J., N. Gavara, R. S. Chadwick, and K. M. Yamada. "Nonpolarized Signaling Reveals Two Distinct Modes of 3d Cell Migration." *J Cell Biol* 197, no. 3 (Apr 30 2012): 439-55.

Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. "Cell Attachment Activity of Fibronectin Can Be Duplicated by Small Synthetic Fragments of the Molecule." *Nature* 309, no. 5963 (May 3-9 1984): 30-3.

Pinner, S., and E. Sahai. "Imaging Amoeboid Cancer Cell Motility in Vivo." *J Microsc* 231, no. 3 (Sep 2008): 441-5.

Pirone, D. M., W. F. Liu, S. A. Ruiz, L. Gao, S. Raghavan, C. A. Lemmon, L. H. Romer, and C. S. Chen. "An Inhibitory Role for Fak in Regulating Proliferation: A Link between Limited Adhesion and Rhoa-Rock Signaling." *J Cell Biol* 174, no. 2 (Jul 17 2006): 277-88.

Polacheck, W. J., I. K. Zervantonakis, and R. D. Kamm. "Tumor Cell Migration in Complex Microenvironments." *Cell Mol Life Sci* 70, no. 8 (Apr 2013): 1335-56.

Polyak, K. "Breast Cancer: Origins and Evolution." *J Clin Invest* 117, no. 11 (Nov 2007): 3155-63.

Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He, and C. M. Perou. "Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer." *Breast Cancer Res* 12, no. 5 (2010): R68.

Provenzano, P. P., D. R. Inman, K. W. Eliceiri, and P. J. Keely. "Matrix Density-Induced Mechanoregulation of Breast Cell Phenotype, Signaling and Gene Expression through a Fak-Erk Linkage." *Oncogene* 28, no. 49 (Dec 10 2009): 4326-43.

Pylayeva, Y., K. M. Gillen, W. Gerald, H. E. Beggs, L. F. Reichardt, and F. G. Giancotti. "Ras- and Pi3k-Dependent Breast Tumorigenesis in Mice and Humans Requires Focal Adhesion Kinase Signaling." *J Clin Invest* 119, no. 2 (Feb 2009): 252-66.

Quann, E. J., X. Liu, G. Altan-Bonnet, and M. Huse. "A Cascade of Protein Kinase C Isozymes Promotes Cytoskeletal Polarization in T Cells." *Nat Immunol* 12, no. 7 (May 22 2011): 647-54.

Rakha, E. A., and S. Chan. "Metastatic Triple-Negative Breast Cancer." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, no. 9 (Nov 2011): 587-600.

Rakha, E. A., and I. O. Ellis. "Triple-Negative/Basal-Like Breast Cancer: Review." *Pathology* 41, no. 1 (Jan 2009): 40-7.

Ren, X. D., and M. A. Schwartz. "Determination of Gtp Loading on Rho." *Methods Enzymol* 325 (2000): 264-72.

Rico, B., H. E. Beggs, D. Schahin-Reed, N. Kimes, A. Schmidt, and L. F. Reichardt. "Control of Axonal Branching and Synapse Formation by Focal Adhesion Kinase." *Nat Neurosci* 7, no. 10 (Oct 2004): 1059-69.

Ridley, A. J. "Life at the Leading Edge." *Cell* 145, no. 7 (Jun 24 2011): 1012-22.

———. "Rho Gtpase Signalling in Cell Migration." *Curr Opin Cell Biol* 36 (Oct 2015): 103-12.

Ritt, M., J. L. Guan, and S. Sivaramakrishnan. "Visualizing and Manipulating Focal Adhesion Kinase Regulation in Live Cells." *J Biol Chem* 288, no. 13 (Mar 29 2013): 8875-86.

Rivenbark, A. G., S. M. O'Connor, and W. B. Coleman. "Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer: Challenges for Personalized Medicine." *Am J Pathol* 183, no. 4 (Oct 2013): 1113-24.

Romer, L. H., N. McLean, C. E. Turner, and K. Burrridge. "Tyrosine Kinase Activity, Cytoskeletal Organization, and Motility in Human Vascular Endothelial Cells." *Mol Biol Cell* 5, no. 3 (Mar 1994): 349-61.

Romond, E. H., E. A. Perez, J. Bryant, V. J. Suman, C. E. Geyer, Jr., N. E. Davidson, E. Tan-Chiu, et al. "Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Operable Her2-Positive Breast Cancer." *N Engl J Med* 353, no. 16 (Oct 20 2005): 1673-84.

Rosse, C., M. Linch, S. Kermorgant, A. J. Cameron, K. Boeckeler, and P. J. Parker. "Pkc and the Control of Localized Signal Dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, no. 2 (Feb 2010): 103-12.

Russell, T. D., S. Jindal, S. Agunbiade, D. Gao, M. Troxell, V. F. Borges, and P. Schedin. "Myoepithelial Cell Differentiation Markers in Ductal Carcinoma in Situ Progression." *Am J Pathol* 185, no. 11 (Nov 2015): 3076-89.

Schaller, M. D. "Cellular Functions of Fak Kinases: Insight into Molecular Mechanisms and Novel Functions." *J Cell Sci* 123, no. Pt 7 (Apr 01 2010): 1007-13.

Schaller, M. D., C. A. Borgman, B. S. Cobb, R. R. Vines, A. B. Reynolds, and J. T. Parsons. "Pp125fak a Structurally Distinctive Protein-Tyrosine Kinase Associated with Focal Adhesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, no. 11 (Jun 01 1992): 5192-6.

Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting. "Smart, a Simple Modular Architecture Research Tool: Identification of Signaling Domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, no. 11 (May 26 1998): 5857-64.

Seguin, L., S. Kato, A. Franovic, M. F. Camargo, J. Lesperance, K. C. Elliott, M. Yebra, et al. "An Integrin Beta(3)-Kras-Ralb Complex Drives Tumour Stemness and Resistance to Egfr Inhibition." *Nat Cell Biol* 16, no. 5 (May 2014): 457-68.

Serreels, B., A. Serreels, V. G. Brunton, M. Holt, G. W. McLean, C. H. Gray, G. E. Jones, and M. C. Frame. "Focal Adhesion Kinase Controls Actin Assembly Via a

Ferm-Mediated Interaction with the Arp2/3 Complex." *Nat Cell Biol* 9, no. 9 (Sep 2007): 1046-56.

Shah, S. P., A. Roth, R. Goya, A. Oloumi, G. Ha, Y. Zhao, G. Turashvili, et al. "The Clonal and Mutational Evolution Spectrum of Primary Triple-Negative Breast Cancers." *Nature* 486, no. 7403 (Apr 04 2012): 395-9.

Shattil, S. J., C. Kim, and M. H. Ginsberg. "The Final Steps of Integrin Activation: The End Game." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, no. 4 (Apr 2010): 288-300.

Shibue, T., and R. A. Weinberg. "Integrin Beta1-Focal Adhesion Kinase Signaling Directs the Proliferation of Metastatic Cancer Cells Disseminated in the Lungs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, no. 25 (Jun 23 2009): 10290-5.

Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, and D. D. Schlaepfer. "Fak Integrates Growth-Factor and Integrin Signals to Promote Cell Migration." *Nat Cell Biol* 2, no. 5 (May 2000): 249-56.

Singel, S. M., C. Cornelius, K. Batten, G. Fasciani, W. E. Wright, L. Lum, and J. W. Shay. "A Targeted Rnai Screen of the Breast Cancer Genome Identifies Kif14 and Tln1 as Genes That Modulate Docetaxel Chemosensitivity in Triple-Negative Breast Cancer." *Clin Cancer Res* 19, no. 8 (Apr 15 2013): 2061-70.

Skvara, H., M. Dawid, E. Kleyn, B. Wolff, J. G. Meingassner, H. Knight, T. Dumortier, et al. "The Pkc Inhibitor Aeb071 May Be a Therapeutic Option for Psoriasis." *J Clin Invest* 118, no. 9 (Sep 2008): 3151-9.

Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, and W. L. McGuire. "Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the Her-2/Neu Oncogene." *Science* 235, no. 4785 (Jan 09 1987): 177-82.

Smith, I., M. Procter, R. D. Gelber, S. Guillaume, A. Feyereislova, M. Dowsett, A. Goldhirsch, et al. "2-Year Follow-up of Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in Her2-Positive Breast Cancer: A Randomised Controlled Trial." *Lancet* 369, no. 9555 (Jan 06 2007): 29-36.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, et al. "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 19 (Sep 11 2001): 10869-74.

Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, et al. "Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, no. 14 (Jul 08 2003): 8418-23..

Soyombo, A. A., Y. Wu, L. Kolski, J. J. Rios, D. Rakheja, A. Chen, J. Kehler, et al. "Analysis of Induced Pluripotent Stem Cells from a Brca1 Mutant Family." *Stem Cell Reports* 1, no. 4 (2013): 336-49.

Stahelin, R. V., K. F. Kong, S. Raha, W. Tian, H. R. Melowic, K. E. Ward, D. Murray, A. Altman, and W. Cho. "Protein Kinase Ctheta C2 Domain Is a Phosphotyrosine Binding Module That Plays a Key Role in Its Activation." *J Biol Chem* 287, no. 36 (Aug 31 2012): 30518-28.

Steinberg, S. F. "Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function." *Physiol Rev* 88, no. 4 (Oct 2008): 1341-78.

Sulzmaier, F. J., C. Jean, and D. D. Schlaepfer. "Fak in Cancer: Mechanistic Findings and Clinical Applications." *Nat Rev Cancer* 14, no. 9 (Sep 2014): 598-610.

Sun, Z., C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, et al. "Pkc-Theta Is Required for Tcr-Induced Nf-Kappab Activation in Mature but Not Immature T Lymphocytes." *Nature* 404, no. 6776 (Mar 23 2000): 402-7.

Sutcliffe, E. L., K. L. Bunting, Y. Q. He, J. Li, C. Phetsouphanh, N. Seddiki, A. Zafar, et al. "Chromatin-Associated Protein Kinase C-Theta Regulates an Inducible Gene Expression Program and Micrnas in Human T Lymphocytes." *Mol Cell* 41, no. 6 (Mar 18 2011): 704-19.

Tachibana, K., T. Sato, N. D'Avirro, and C. Morimoto. "Direct Association of Pp125fak with Paxillin, the Focal Adhesion-Targeting Mechanism of Pp125fak." *J Exp Med* 182, no. 4 (Oct 01 1995): 1089-99.

Takai, Y., A. Kishimoto, M. Inoue, and Y. Nishizuka. "Studies on a Cyclic Nucleotide-Independent Protein Kinase and Its Proenzyme in Mammalian Tissues. I. Purification and Characterization of an Active Enzyme from Bovine Cerebellum." *J Biol Chem* 252, no. 21 (Nov 10 1977): 7603-9.

Tamkun, J. W., D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, and R. O. Hynes. "Structure of Integrin, a Glycoprotein Involved in the Transmembrane Linkage between Fibronectin and Actin." *Cell* 46, no. 2 (Jul 18 1986): 271-82.

Tang, S., K. G. Morgan, C. Parker, and J. A. Ware. "Requirement for Protein Kinase C Theta for Cell Cycle Progression and Formation of Actin Stress Fibers and Filopodia in Vascular Endothelial Cells." *J Biol Chem* 272, no. 45 (Nov 07 1997): 28704-11.

Taylor, J. M., M. M. Macklem, and J. T. Parsons. "Cytoskeletal Changes Induced by Graf, the Gtpase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase, Are Mediated by Rho." *J Cell Sci* 112 (Pt 2) (Jan 1999): 231-42.

Thievensen, I., P. M. Thompson, S. Berlemont, K. M. Plevock, S. V. Plotnikov, A. Zemljic-Harpf, R. S. Ross, et al. "Vinculin-Actin Interaction Couples Actin Retrograde Flow to Focal Adhesions, but Is Dispensable for Focal Adhesion Growth." *J Cell Biol* 202, no. 1 (Jul 08 2013): 163-77.

Tomar, A., S. T. Lim, Y. Lim, and D. D. Schlaepfer. "A Fak-P120rasgap-P190rhogap Complex Regulates Polarity in Migrating Cells." *J Cell Sci* 122, no. Pt 11 (Jun 01 2009): 1852-62.

Tomar, A., and D. D. Schlaepfer. "Focal Adhesion Kinase: Switching between Gaps and Gef's in the Regulation of Cell Motility." *Curr Opin Cell Biol* 21, no. 5 (Oct 2009): 676-83.

Tonetti, D. A., W. Gao, D. Escarzaga, K. Walters, A. Szafran, and J. S. Coon. "Pkcalpha and Erbeta Are Associated with Triple-Negative Breast Cancers in African American and Caucasian Patients." *Int J Breast Cancer* 2012 (2012): 740353.

Torres, L., F. R. Ribeiro, N. Pandis, J. A. Andersen, S. Heim, and M. R. Teixeira. "Intratumor Genomic Heterogeneity in Breast Cancer with Clonal Divergence

between Primary Carcinomas and Lymph Node Metastases." *Breast Cancer Res Treat* 102, no. 2 (Apr 2007): 143-55.

Trimboli, A. J., K. Fukino, A. de Bruin, G. Wei, L. Shen, S. M. Tanner, N. Creasap, et al. "Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer." *Cancer Res* 68, no. 3 (Feb 01 2008): 937-45.

Turdo, F., F. Bianchi, P. Gasparini, M. Sandri, M. Sasso, L. De Cecco, L. Forte, et al. "Cdc1 Is a Novel Marker of the Most Aggressive Human Triple-Negative Breast Cancers." *Oncotarget* 7, no. 43 (Oct 25 2016): 69649-65.

Turner, C. E., M. C. Brown, J. A. Perrotta, M. C. Riedy, S. N. Nikolopoulos, A. R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas, and P. S. Leventhal. "Paxillin Ld4 Motif Binds Pak and Pix through a Novel 95-Kd Ankyrin Repeat, Arf-Gap Protein: A Role in Cytoskeletal Remodeling." *J Cell Biol* 145, no. 4 (May 17 1999): 851-63.

Tybulewicz, V. L., and R. B. Henderson. "Rho Family Gtpases and Their Regulators in Lymphocytes." *Nat Rev Immunol* 9, no. 9 (Sep 2009): 630-44.

Uekita, T., and R. Sakai. "Roles of Cub Domain-Containing Protein 1 Signaling in Cancer Invasion and Metastasis." *Cancer Sci* 102, no. 11 (Nov 2011): 1943-8.

Urtreger, A. J., M. G. Kazanietz, and E. D. Bal de Kier Joffe. "Contribution of Individual Pkc Isoforms to Breast Cancer Progression." *IUBMB Life* 64, no. 1 (Jan 2012): 18-26.

Usary, J., V. Llaca, G. Karaca, S. Presswala, M. Karaca, X. He, A. Langerod, et al. "Mutation of Gata3 in Human Breast Tumors." *Oncogene* 23, no. 46 (Oct 07 2004): 7669-78.

Valastyan, S., and R. A. Weinberg. "Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms." *Cell* 147, no. 2 (Oct 14 2011): 275-92.

van Miltenburg, M. H., M. J. van Nimwegen, I. Tijdens, R. Lalai, R. Kuiper, S. Klarenbeek, P. C. Schouten, et al. "Mammary Gland-Specific Ablation of Focal Adhesion Kinase Reduces the Incidence of P53-Mediated Mammary Tumour Formation." *Br J Cancer* 110, no. 11 (May 27 2014): 2747-55.

Vicente-Manzanares, M., and A. R. Horwitz. "Adhesion Dynamics at a Glance." *J Cell Sci* 124, no. Pt 23 (Dec 01 2011): 3923-7.

Villalba, M., K. Bi, J. Hu, Y. Altman, P. Bushway, E. Reits, J. Neefjes, et al. "Translocation of Pkc[Theta] in T Cells Is Mediated by a Nonconventional, Pi3-K- and Vav-Dependent Pathway, but Does Not Absolutely Require Phospholipase C." *J Cell Biol* 157, no. 2 (Apr 15 2002): 253-63.

Visvader, J. E. "Keeping Abreast of the Mammary Epithelial Hierarchy and Breast Tumorigenesis." *Genes Dev* 23, no. 22 (Nov 15 2009): 2563-77..

Vuori, K., and E. Ruoslahti. "Activation of Protein Kinase C Precedes Alpha 5 Beta 1 Integrin-Mediated Cell Spreading on Fibronectin." *J Biol Chem* 268, no. 29 (Oct 15 1993): 21459-62.

Walerych, D., M. Napoli, L. Collavin, and G. Del Sal. "The Rebel Angel: Mutant P53 as the Driving Oncogene in Breast Cancer." *Carcinogenesis* 33, no. 11 (Nov 2012): 2007-17.

Walsh, C., I. Tanjoni, S. Uryu, A. Tomar, J. O. Nam, H. Luo, A. Phillips, et al. "Oral Delivery of Pnd-1186 Fak Inhibitor Decreases Tumor Growth and Spontaneous Breast to Lung Metastasis in Pre-Clinical Models." *Cancer Biol Ther* 9, no. 10 (May 15 2010): 778-90.

Wang, D., Y. You, S. M. Case, L. M. McAllister-Lucas, L. Wang, P. S. DiStefano, G. Nunez, J. Bertin, and X. Lin. "A Requirement for Carma1 in Tcr-Induced Nf-Kappa B Activation." *Nat Immunol* 3, no. 9 (Sep 2002): 830-5.

Wang, P., C. Ballestrem, and C. H. Streuli. "The C Terminus of Talin Links Integrins to Cell Cycle Progression." *J Cell Biol* 195, no. 3 (Oct 31 2011): 499-513.

Wang, X., H. C. Chuang, J. P. Li, and T. H. Tan. "Regulation of Pkc-Theta Function by Phosphorylation in T Cell Receptor Signaling." *Front Immunol* 3 (2012): 197.

Ways, D. K., C. A. Kukoly, J. deVente, J. L. Hooker, W. O. Bryant, K. J. Posekany, D. J. Fletcher, P. P. Cook, and P. J. Parker. "Mcf-7 Breast Cancer Cells Transfected with Protein Kinase C-Alpha Exhibit Altered Expression of Other Protein Kinase C

Isoforms and Display a More Aggressive Neoplastic Phenotype." *J Clin Invest* 95, no. 4 (Apr 1995): 1906-15.

Webb, D. J., K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons, and A. F. Horwitz. "Fak-Src Signalling through Paxillin, Erk and Mlck Regulates Adhesion Disassembly." *Nat Cell Biol* 6, no. 2 (Feb 2004): 154-61.

Weiner, T. M., E. T. Liu, R. J. Craven, and W. G. Cance. "Expression of Focal Adhesion Kinase Gene and Invasive Cancer." *Lancet* 342, no. 8878 (Oct 23 1993): 1024-5.

———. "Expression of Growth Factor Receptors, the Focal Adhesion Kinase, and Other Tyrosine Kinases in Human Soft Tissue Tumors." *Ann Surg Oncol* 1, no. 1 (Jan 1994): 18-27.

Westhoff, M. A., B. Serrels, V. J. Fincham, M. C. Frame, and N. O. Carragher. "Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling." *Mol Cell Biol* 24, no. 18 (Sep 2004): 8113-33.

Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E. B. Brocker, and P. Friedl. "Compensation Mechanism in Tumor Cell Migration: Mesenchymal-Amoeboid Transition after Blocking of Pericellular Proteolysis." *J Cell Biol* 160, no. 2 (Jan 20 2003): 267-77.

Wolfenson, H., I. Lavelin, and B. Geiger. "Dynamic Regulation of the Structure and Functions of Integrin Adhesions." *Dev Cell* 24, no. 5 (Mar 11 2013): 447-58.

Wortmann, A., Y. He, M. E. Christensen, M. Linn, J. W. Lumley, P. M. Pollock, N. J. Waterhouse, and J. D. Hooper. "Cellular Settings Mediating Src Substrate Switching between Focal Adhesion Kinase Tyrosine 861 and Cub-Domain-Containing Protein 1 (Cdc41) Tyrosine 734." *J Biol Chem* 286, no. 49 (Dec 09 2011): 42303-15.

Wright, H. J., J. Arulmoli, M. Motazed, L. J. Nelson, F. S. Heinemann, L. A. Flanagan, and O. V. Razorenova. "Cdc41 Cleavage Is Necessary for Homodimerization-Induced Migration of Triple-Negative Breast Cancer." *Oncogene* 35, no. 36 (Sep 08 2016): 4762-72.

Wyckoff, J. B., S. E. Pinner, S. Gschmeissner, J. S. Condeelis, and E. Sahai. "Rock- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion in Vivo." *Curr Biol* 16, no. 15 (Aug 08 2006): 1515-23.

.

Xie, Z., K. Sanada, B. A. Samuels, H. Shih, and L. H. Tsai. "Serine 732 Phosphorylation of Fak by Cdk5 Is Important for Microtubule Organization, Nuclear Movement, and Neuronal Migration." *Cell* 114, no. 4 (Aug 22 2003): 469-82.

Xu, Y., N. Benlimame, J. Su, Q. He, and M. A. Alaoui-Jamali. "Regulation of Focal Adhesion Turnover by Erbb Signalling in Invasive Breast Cancer Cells." *Br J Cancer* 100, no. 4 (Feb 24 2009): 633-43.

Xu, Z. B., D. Chaudhary, S. Olland, S. Wolfrom, R. Czerwinski, K. Malakian, L. Lin, et al. "Catalytic Domain Crystal Structure of Protein Kinase C-Theta (Pkctheta)." *J Biol Chem* 279, no. 48 (Nov 26 2004): 50401-9.

Yang, C., and T. Svitkina. "Filopodia Initiation: Focus on the Arp2/3 Complex and Formins." *Cell Adh Migr* 5, no. 5 (Sep-Oct 2011): 402-8.

Yap, T. A., A. Omlin, and J. S. de Bono. "Development of Therapeutic Combinations Targeting Major Cancer Signaling Pathways." *J Clin Oncol* 31, no. 12 (Apr 20 2013): 1592-605.

Yom, C. K., D. Y. Noh, W. H. Kim, and H. S. Kim. "Clinical Significance of High Focal Adhesion Kinase Gene Copy Number and Overexpression in Invasive Breast Cancer." *Breast Cancer Res Treat* 128, no. 3 (Aug 2011): 647-55.

Yoon, H., J. P. Dehart, J. M. Murphy, and S. T. Lim. "Understanding the Roles of Fak in Cancer: Inhibitors, Genetic Models, and New Insights." *J Histochem Cytochem* 63, no. 2 (Feb 2015): 114-28.

Zaoui, K., S. Honore, D. Isnardon, D. Braguer, and A. Badache. "Memo-Rhoa-Mdia1 Signaling Controls Microtubules, the Actin Network, and Adhesion Site Formation in Migrating Cells." *J Cell Biol* 183, no. 3 (Nov 03 2008): 401-8.

Zardavas, D., T. M. Fouad, and M. Piccart. "Optimal Adjuvant Treatment for Patients with Her2-Positive Breast Cancer in 2015." *Breast* 24 Suppl 2 (Nov 2015): S143-8.

Zardavas, D., W. A. Phillips, and S. Loi. "Pik3ca Mutations in Breast Cancer: Reconciling Findings from Preclinical and Clinical Data." *Breast Cancer Res* 16, no. 1 (Jan 23 2014): 201.

Zhai, J., H. Lin, Z. Nie, J. Wu, R. Canete-Soler, W. W. Schlaepfer, and D. D. Schlaepfer. "Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase with P190rhogef." *J Biol Chem* 278, no. 27 (Jul 04 2003): 24865-73.

Zhang, E. Y., K. F. Kong, and A. Altman. "The Yin and Yang of Protein Kinase C-Theta (Pkctheta): A Novel Drug Target for Selective Immunosuppression." *Adv Pharmacol* 66 (2013): 267-312.

Zhao, J. H., H. Reiske, and J. L. Guan. "Regulation of the Cell Cycle by Focal Adhesion Kinase." *J Cell Biol* 143, no. 7 (Dec 28 1998): 1997-2008.

Zhao, X., and J. L. Guan. "Focal Adhesion Kinase and Its Signaling Pathways in Cell Migration and Angiogenesis." *Adv Drug Deliv Rev* 63, no. 8 (Jul 18 2011): 610-5.

Auteur : Lucie CHADELLE

Titre : Contrôle de l'invasion par la PKC θ dans les cancers du sein.

Résumé : Entre 15 et 20% des cancers du sein diagnostiqués sont des cancers du sein triple-négatifs (CSTN). Ce sous-type de cancer du sein est caractérisé par l'absence ou le faible niveau d'expression du récepteur au facteur de croissance épidermique de type 2 (HER2) et des récepteurs hormonaux à l'œstrogène et à la progestérone. Par définition, les patientes atteintes de CSTN ne peuvent bénéficier des traitements antihormonaux ou des thérapies ciblées anti-HER2 qui ont nettement amélioré la prise en charge thérapeutique des autres sous-types de cancers du sein. En marge de ces progrès, les CSTN sont ainsi principalement traités par chimiothérapies cytotoxiques, des thérapies ne parvenant pas toujours à empêcher leur dissémination métastatique. Par conséquent, les CSTN sont aujourd'hui associés à des pronostics relativement mauvais et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques constitue un enjeu majeur de la recherche sur le cancer du sein.

C'est dans ce contexte qu'une cible thérapeutique potentielle contre les CSTN a récemment été identifiée: la sérine-thréonine kinase PKC θ (PKC θ). Cette PKC nouvelle est fortement exprimée dans les CSTN alors qu'elle ne l'est pas, ou très faiblement, dans des cancers du sein exprimant le récepteur aux œstrogènes et dans les tissus mammaires non transformés.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier la fonction de PKC θ dans le contrôle de l'invasion de cellules tumorales mammaires, une étape clé de la formation de métastases.

Nos travaux montrent qu'une inhibition de PKC θ aboutit à une nette diminution des capacités invasives de lignées de cellules CSTN *in vitro*. De même, *in vivo* cette inhibition limite fortement la formation de métastases chez la souris. Nous identifions le mécanisme moléculaire par lequel PKC θ contrôle l'invasion: PKC θ est capable d'activer la voie des adhérences focales en phosphorylant directement la kinase des adhérences focales (FAK) sur des sites de phosphorylations encore jamais identifiés, les sérines 892 et 893. Ces phosphorylations sont essentielles aux effets positifs de PKC θ sur l'invasion et la FAK phosphorylée de la sorte est retrouvée spécifiquement au front de cellules CSTN en migration. De façon intéressante, ces phosphorylations de FAK par PKC θ permettent une modification de la dynamique de formation des adhérences cellule/matrice ainsi que celle des protrusions. Le contrôle de ces protrusions passe très certainement par une altération de la dynamique d'activité des RhoGTPases induite par PKC θ . De surcroît, l'utilisation d'une PKC θ activable par la rapamycine nous permet de finement étudier la temporalité des effets de PKC θ sur la génération des protrusions et des adhérences cellule/matrice. Enfin, concernant le contrôle de l'activité de PKC θ en amont, nous constatons que son activation de même que ses effets sur la voie FAK et l'invasion dépendent entièrement de CDCP1 (Cub Domain-Containing Protein 1), un récepteur transmembranaire associé à l'agressivité de plusieurs cancers, dont les CSTN.

Mes travaux mettent ainsi en évidence un mécanisme inédit de contrôle de la voie FAK permettant l'invasion de cellules tumorales mammaires. De plus, ils valident PKC θ en tant que cible thérapeutique potentielle dont l'inhibition pourrait permettre de limiter la dissémination métastatique des CSTN et ce, sans effets secondaires majeurs, la fonction physiologique de PKC θ étant non essentielle.

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Contrôle de la Prolifération, UMR5088